

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000708

International filing date: 20 January 2005 (20.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-014654  
Filing date: 22 January 2004 (22.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

04. 2. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年   1 月 2 2 日  
Date of Application:

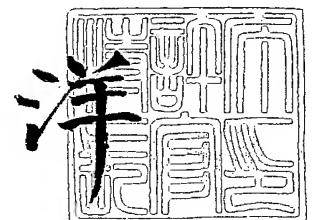
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 0 1 4 6 5 4  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 4 - 0 1 4 6 5 4 ]

出      願      人                      株式会社ダイナベック研究所  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 1 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 D3-A0401  
【提出日】 平成16年 1月22日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ダイナベック研究所内  
    【氏名】 井上 誠  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ダイナベック研究所内  
    【氏名】 伴 浩志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ダイナベック研究所内  
    【氏名】 飯田 章博  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ダイナベック研究所内  
    【氏名】 長谷川 護  
【特許出願人】  
    【識別番号】 595155107  
    【氏名又は名称】 株式会社ダイナベック研究所  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9716812

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスを製造する方法であって、(i) 該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列を他のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質、および (ii) 該他のプロテアーゼ、の存在下で該ウイルスを産生させる工程を含み、産生されるウイルスは、切断された該改変ウイルス蛋白質を含み、該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を含まない、方法。

**【請求項 2】**

製造されるウイルスが、野生型切断配列を持つ該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を保持する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

製造されるウイルスが、該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を欠失する非伝播性ウイルスである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

該他のプロテアーゼがフューリンである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Arg を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

該ウイルスがマイナス鎖RNAウイルスである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

該マイナス鎖RNAウイルスがセンダイウイルスである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスにおける、該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列を、他のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質をコードするベクターであって、該ウイルスの生産細胞において増殖できないウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、ベクター。

**【請求項 12】**

プラスミドである、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 13】**

該改変ウイルス蛋白質が、リコンビナーゼにより発現誘導可能である、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 14】**

該リコンビナーゼがCreまたはFlpである、請求項 13 に記載のベクター。

**【請求項 15】**

該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 16】**

該他のプロテアーゼがフューリンである、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 17】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg を含む、請求項 11 に記載のベクター。



**【請求項 18】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Arg を含む、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 19】**

該ウイルス蛋白質がマイナス鎖RNAウイルスのF蛋白質である、請求項 11 に記載のベクター。

**【請求項 20】**

該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、請求項 19 に記載のベクター。

**【請求項 21】**

該マイナス鎖RNAウイルスがセグダイウイルスである、請求項 19 に記載のベクター。

**【請求項 22】**

請求項 11 に記載のベクターを含む哺乳動物細胞。

**【請求項 23】**

プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスの生産用細胞である、請求項 22 に記載の細胞。

**【請求項 24】**

該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子が、該細胞の染色体に組み込まれている、請求項 22 に記載の細胞。

**【請求項 25】**

ヒト細胞である、請求項 22 に記載の細胞。

**【請求項 26】**

増殖がプロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に依存するウイルスの改変ウイルスであって、該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列が、他のプロテアーゼの切断配列に改変された改変ウイルス蛋白質を含み、該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を含まない改変ウイルス。

**【請求項 27】**

製造されるウイルスが、野生型切断配列を持つ該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を保持する、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 28】**

ウイルスが、該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を欠失する非伝播型ウイルスである、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 29】**

該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 30】**

該他のプロテアーゼがフェューリンである、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 31】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg を含む、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 32】**

該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Arg を含む、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 33】**

該ウイルスがマイナス鎖RNAウイルスであり、該ウイルス蛋白質がF蛋白質である、請求項 26 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 34】**

該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、請求項 33 に記載の改変ウイルス。

**【請求項 35】**



該マイナス鎖RNAウイルスがセンダイウイルスである、請求項 3 3 に記載の改変ウイルス。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】ウイルスベクターの製造方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、増殖をプロテアーゼに依存するウイルスベクターの改良された製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多くのウイルスの構造蛋白質は、プロテアーゼによるプロセッシングを受けて、初めて活性を発現する。このようなウイルスを組み換えウイルスベクターとして製造するには、そのプロテアーゼの存在下でウイルスを増殖させる必要がある。例えばマイナス鎖RNAウイルスのエンベロープに含まれるF蛋白質はそのような蛋白質の1つであり、F蛋白質 (F0) は、宿主由来のプロテアーゼによりF1とF2に開裂して初めて感染性を示すようになる。

## 【0003】

マイナス鎖RNAウイルスであるセンダイウイルス (SeV) は、遺伝子導入効率 (感染性) が高く搭載遺伝子発現量が多いという特長を有し、有効な遺伝子導入用ベクターの一つとして期待されている。また、ヒトに対して病原性が知られておらず、更にゲノムへの遺伝子組込みなどの遺伝的毒性は皆無であり、安全性も高いと考えられている (Lamb, R.A. & Kolakofsky, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. p. 1177-1204. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Fields virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa (1996))。これらの点から、センダイウイルスは「細胞質型遺伝子導入ベクター」として、従来型のベクターとは異なる新たなタイプのベクターとしての研究・開発が実施されている段階にある。特にヒトへの遺伝子治療を目的として、ウイルスゲノムの一部の遺伝子をゲノムから欠失することによって、安全性の高いウイルスベクターへの改良が試みられている。

## 【0004】

例えば遺伝子欠失型センダイウイルスの例として、F遺伝子欠失型SeVの場合、高タイターでの回収を可能にするためには欠失した蛋白をトランスに供給するパッケージング細胞であり、その作出こそが最も重要である。現在までに、F遺伝子欠失型SeVベクター (SeV/ $\Delta$ F: Li, H.O. et al., J.Virol. 74, 6564-6569 (2000)) 或いはM遺伝子欠失型SeVベクター (SeV/ $\Delta$ M: Inoue, M. et al., J.Virol. 77, 6419-6429 (2003)) などの生産系が開発されており、F蛋白質或いはM蛋白質をトランスに供給可能なパッケージング細胞が作出されている。ゲノムから感染・融合に必須であるF遺伝子を欠失することにより、感染細胞からの感染性粒子の放出が無くなり、非伝播型のベクターに改変される。ゲノムから粒子形成に必須のM遺伝子を欠失することにより、感染細胞からの粒子放出そのものが検出限界以下まで抑制される。特に、SeV/ $\Delta$ Fは、導入細胞内ではゲノムの自律複製が可能であり、搭載遺伝子を高発現する能力を維持したまま非伝播型となっており、画期的な技術となっている。

## 【0005】

SeVは、その受容体として細胞にユビキタスに存在しているシアル酸を利用するにも関わらず、その宿主動物 (げっ歯類など) の体内において、非常に狭い範囲での組織トロピズムを示す。例えば、マウスの気道、或いはニワトリ有精卵の漿尿液中でのみ効率的に増殖する。このトロピズムの制限は、F蛋白の活性化に必要な特異的プロテアーゼの局在に因るものであり (Nagai, Y. Trends Microbiol 1, 81-87 (1993))、有精卵の漿尿膜においてはblood clotting factor Xa (Gotoh, B. et al. EMBO J 9, 4189-4195 (1990)) が、マウス気道の上皮細胞においてはtryptase Clara (Kido, H. et al. J Biol Chem 267, 13573-13579 (1992)) が機能している。これらのプロテアーゼに対するF蛋白 (F0蛋白) の切断のモチーフはQ-S-Rである。ほとんどの細胞種の培養系においては、F蛋白を活性化する (F0蛋白のQ-S-Rモチーフを切断する) プロテアーゼの発現がないために、in vitroでSeVを増やすには天然のプロテアーゼに変えて低濃度のtrypsin (7.5  $\mu$ g/ml) を添加す

ることが必要になる (Homma, M. & Ouchi, M. J Virol 12, 1457-1465 (1973))。

【0006】

F遺伝子欠失型SeVベクター (SeV/ $\Delta$ F) を調製する場合も、同様にF蛋白の活性化が必要であり、ベクター生産時はトリプシンを添加し、またトリプシンを機能させるために無血清条件下で培養する必要がある。このような、無血清条件のトリプシン存在下での培養は細胞にとっては極めて過酷な条件であり、ほとんどの細胞では細胞を維持できる期間が非常に短くなり、パッケージング細胞として機能出来ない。実際にパッケージング細胞として使用可能なのは、サル腎細胞であるLLC-MK2細胞、或いはハムスター腎細胞であるBHK-21細胞など数種に限られている。則ち、無血清条件下のトリプシン存在下という培養条件によって、パッケージング細胞に利用可能な細胞種が極めて少数に制限されている。

【非特許文献1】 Lamb, R.A. & Kolakofsky, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. p. 1177-1204. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Fields virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa (1996)

【非特許文献2】 Li, H.O. et al., J.Virol. 74, 6564-6569 (2000)

【非特許文献3】 Inoue, M. et al., J.Virol. 77, 6419-6429 (2003)

【非特許文献4】 Nagai, Y. Trends Microbiol 1, 81-87 (1993)

【非特許文献5】 Gotoh, B. et al. EMBO J 9, 4189-4195 (1990)

【非特許文献6】 Kido, H. et al. J Biol Chem 267, 13573-13579 (1992)

【非特許文献7】 Homma, M. & Ouchi, M. J Virol 12, 1457-1465 (1973)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、増殖をプロテアーゼに依存するウイルスを、該プロテアーゼに依存せず、他のプロテアーゼを用いて製造する方法を提供する。本発明の方法は、効率的にウイルスベクターを製造することを可能にする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上述のように、ウイルス生産の際にプロテアーゼが必要な場合、そのプロテアーゼを作用させるために細胞のバイアビリティーが下がり、ウイルス生産に使用できる細胞種が極めて少数に制限されてしまうという問題があった。ウイルスベクターを生産する場合、ウイルス生産細胞 (パッケージング細胞) からの出芽や放出により感染性を有する娘粒子を産生する。この場合、娘粒子にはアクチンなどパッケージング細胞由来の細胞質成分 (及び細胞膜成分) が混入すると予想されている。実際にヒトへの遺伝子治療を考えた場合、例えば大量に投与する必要がある場合には、粒子に混入する細胞質成分 (及び細胞膜成分) が、サル細胞由来或いはハムスター細胞由来ではなくヒト細胞由来であることが望ましいと考えられる。しかしながら、例えばセンダイウイルス等の場合は、上記のように「無血清条件下のトリプシン存在下という培養条件」で生存可能な細胞を使用する必要があるため、パッケージング細胞として利用可能な細胞種が極めて少数に制限され、ヒト細胞への応用が困難であった。そこで本発明者らは、培養条件をほとんどの細胞に応用可能な手法の開発を試みた。

【0009】

細胞のtrans-Golgi network, 細胞表面及びendosomeには、furinと呼ばれる膜結合型のserine endoproteaseが存在している。furinの発現はubiquitousであり、ほとんどの組織・細胞で発現しており、細胞内蛋白だけでなく、膜蛋白及び分泌蛋白のprocessingに関与している (Seidah, N.G. & Chretien, M. Brain Res. 848, 45-62 (1999), Bergeron, F. et al., J. Mol. Endocrinol. 24, 1-22 (2000), Steiner, D.F. Curr. Opin. Chem. Biol. 2 31-39 (1998))。ウイルスの膜蛋白質もfurinによるprocessingを受けているものがあり、パラミクソウイルス科のウイルスF蛋白質の中では、全臓器向性のウイルス或いは一部の強毒株においては、furin認識配列を有するものが多い (Toyoda, T. et al., Virology 157, 242-247 (1987))。例えば、NDVの強毒株 (Nagai, Y. et al., Virology 72

, 494-5-8 (1976))、麻疹ウイルスやムンプスウイルス、或いはHRSVやHPIV-3 (Nagai, Y. Trends Microbiol. 1, 81-87 (1993)) などがfurinの認識配列を有している。一方、典型的な局所感染型のSeVやHPIV-1の場合は、furinの認識配列を有していない(ウイルス学, 畑中正一編集, 東京, 朝倉書店, 1997, pp. 247-248を参照)。

#### 【0010】

この細胞種に因らずにubiquitousに発現しているfurinの活性を利用すれば、細胞株に関係なくその活性を利用することが可能になると考えられた。則ち、furin認識配列を導入したF遺伝子を導入したパッケージング細胞が作出できれば、F蛋白質を活性化するためのtrypsinを培地に添加する必要がなく、さらにそのために無血清状態にする必要もなくなる。培養条件に制約がなくなること、パッケージング細胞として利用可能な細胞の選択肢が増え、特にヒト細胞を利用したパッケージング細胞の作出が可能になる。

#### 【0011】

応用の手法はパラミクソウイルス科以外のウイルスベクターの生産にも利用可能である。例えば他の科のウイルスについても、膜融合活性の発現はウイルス前駆体糖蛋白質のプロテアーゼによる切断プロセッシングを前提としており、例えば、ヒトインフルエンザウイルスAは局所感染型の配列(furin認識配列なし)であり、エイズウイルスを含む多くのウイルスは全臓器向性の配列(furin認識配列あり)を有している。このように、多くのウイルスについてウイルス糖蛋白質前駆体の宿主プロテアーゼによる活性化はウイルストロピズムを支配する重要な因子であることから、本発明の方法によるパッケージング細胞作出の方法は、パラミクソウイルスに限定されることなく、多くのウイルスベクターのパッケージング細胞を作出する場合に応用できるものと考えられる。

#### 【0012】

すなわち本発明は、増殖をプロテアーゼに依存するウイルスを、該プロテアーゼに依存せずに製造する方法に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお本発明は、請求項の各項に記載の発明の1つまたは複数(または全部)の所望の組み合わせからなる発明、特に、同一の独立項(他の項に記載の発明に包含されない発明に関する項)を引用する項(従属項)に記載の発明の1つまたは複数(または全部)の所望の組み合わせからなる発明にも関する。各独立項に記載の発明には、その従属項の任意の組み合わせからなる発明も意図されている。すなわち本発明は、

〔1〕 プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスを製造する方法であって、(i) 該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列を他のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質、および(ii) 該他のプロテアーゼ、の存在下で該ウイルスを産生させる工程を含み、産生されるウイルスは、切断された該改変ウイルス蛋白質を含み、該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を含まない、方法、

〔2〕 製造されるウイルスが、野生型切断配列を持つ該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を保持する、〔1〕に記載の方法、

〔3〕 製造されるウイルスが、該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を欠失する非伝播性ウイルスである、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔4〕 該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の方法、

〔5〕 該他のプロテアーゼがフューリンである、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の方法、

〔6〕 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Argを含む、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の方法、

〔7〕 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Argを含む、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の方法、

〔8〕 該ウイルスがマイナス鎖RNAウイルスである、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の方法、

〔9〕 該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、〔8〕に記載の方法、

- [10] 該マイナス鎖RNAウイルスがセンダイウイルスである、[8]に記載の方法、
- [11] プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスにおける、該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列を、他のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質をコードするベクターであって、該ウイルスの生産細胞において増殖できないウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、ベクター、
- [12] プラスミドである、[11]に記載のベクター、
- [13] 該改変ウイルス蛋白質が、リコンビナーゼにより発現誘導可能である、[11]または[12]に記載のベクター、
- [14] 該リコンビナーゼがCreまたはFlpである、[13]に記載のベクター、
- [15] 該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、[11]から[14]のいずれかに記載のベクター、
- [16] 該他のプロテアーゼがフューリンである、[11]から[15]のいずれかに記載のベクター、
- [17] 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg を含む、[11]から[16]のいずれかに記載のベクター、
- [18] 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Arg を含む、[11]から[16]のいずれかに記載のベクター、
- [19] 該ウイルス蛋白質がマイナス鎖RNAウイルスのF蛋白質である、[11]から[18]のいずれかに記載のベクター、
- [20] 該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、[19]に記載のベクター、
- [21] 該マイナス鎖RNAウイルスがセンダイウイルスである、[19]に記載のベクター、
- [22] [11]から[21]のいずれかに記載のベクターを含む哺乳動物細胞、
- [23] プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスの生産用細胞である、[22]に記載の細胞、
- [24] 該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子が、該細胞の染色体に組み込まれている、[22]または[23]に記載の細胞、
- [25] ヒト細胞である、[22]から[24]のいずれかに記載の細胞、
- [26] 増殖がプロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に依存するウイルスの改変ウイルスであって、該ウイルス蛋白質の該プロテアーゼによる切断配列が、他のプロテアーゼの切断配列に改変された改変ウイルス蛋白質を含み、該改変ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を含まない改変ウイルス、
- [27] 製造されるウイルスが、野生型切断配列を持つ該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を保持する、[26]に記載の改変ウイルス、
- [28] ウイルスが、該ウイルス蛋白質をコードする遺伝子を欠失する非伝播型ウイルスである、[26]に記載の改変ウイルス、
- [29] 該他のプロテアーゼが、ウイルスを生産させる細胞が内因的に発現するプロテアーゼである、[26]から[28]のいずれかに記載の改変ウイルス、
- [30] 該他のプロテアーゼがフューリンである、[26]から[29]のいずれかに記載の改変ウイルス、
- [31] 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg を含む、[26]から[30]のいずれかに記載の改変ウイルス、
- [32] 該他のプロテアーゼの切断配列が、Arg-Arg-Arg-Arg を含む、[26]から[30]のいずれかに記載の改変ウイルス、
- [33] 該ウイルスがマイナス鎖RNAウイルスであり、該ウイルス蛋白質がF蛋白質である、[26]から[32]のいずれかに記載の改変ウイルス、
- [34] 該マイナス鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科ウイルスである、[33]に記載の改変ウイルス、
- [35] 該マイナス鎖RNAウイルスがセンダイウイルスである、[33]に記載の改変

ウイルス、に関する。

【0013】

本発明においてウイルスベクターとは、感染力を持つウイルス粒子であって、遺伝子を細胞に導入するための担体を言う。ここで「感染力」とは、ウイルスベクターが細胞への接触により細胞の内部にベクターに含まれる遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。本発明のウイルスの製造方法は、伝播能を有するウイルスベクターの製造、および伝播能を有さない欠損型ベクターの製造の両方に適用することができる。ここで「伝播能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

【0014】

組み換えウイルスとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルス、またはそのウイルスの増幅産物を言う。組み換えポリヌクレオチドとは、両端または片端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖の結合が改変（切断および/または結合）されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。

【0015】

本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、転写単位をコードする核酸を言う。遺伝子はRNAであってもDNAであってもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また一般に、遺伝子は蛋白質をコードしていなくてもよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。一般に、遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンス（例えばマイナス鎖RNAウイルスにおいて）に含むことを言う。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスを、該プロテアーゼに非依存的に製造する方法を提供する。例えば宿主由来のプロテアーゼに増殖を依存するウイルスを増殖させるためには、本来、そのプロテアーゼがウイルスに供給される必要がある。しかしながら本発明においては、該プロテアーゼ（仮に本来のプロテアーゼと称す）の基質となるウイルス蛋白質の切断配列を、他のプロテアーゼ（第2のプロテアーゼと称す）の切断配列に改変することによって、該本来のプロテアーゼを必要とせず、第2のプロテアーゼによりウイルスを生産させることが特徴である。

【0017】

すなわち、該ウイルス蛋白質の本来のプロテアーゼによる切断配列を第2のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質と、第2のプロテアーゼとの存在下でウイルスを生産させる工程により、第2のプロテアーゼの切断配列を持つ改変ウイルス蛋白質は、第2のプロテアーゼによる切断を受けて活性化し、ウイルスは増殖することができる。ここで、第2のプロテアーゼは、生産されるウイルス自身は発現しない。すなわち、生産されるウイルスは、第2のプロテアーゼをコードする遺伝子を保持しない。従って、生産されたウイルスは、切断部位が改変された改変型のウイルス蛋白質がトランスに供給されないかぎり、第2のプロテアーゼがあっても増殖することができない点が特徴である。

【0018】

本発明の方法は、プロテアーゼ切断配列を他の配列に置換する以外は、ウイルス遺伝子またはウイルス蛋白質を改変することは必須ではない。従って、生産されるウイルスと本

来のウイルスとの遺伝子型は全く同一にすることも可能である。また、改変ウイルス蛋白質と野生型ウイルス蛋白質との違いはプロテアーゼ切断部位だけでよいので、形質的な変化も最小限に抑えられ、ウイルスの形成、増殖、遺伝子発現等に与える影響はほとんどないと考えられる。従って、本発明の方法は極めて汎用性が高く、プロテアーゼに増殖を依存する多くのウイルスの製造に適用することが可能と考えられる。

#### 【0019】

本発明の方法が適用できるウイルスとしては、例えば、パラミクソウイルス科のウイルスを例に挙げれば、もともと furin 認識配列を有さず典型的に局所感染型の性質を示す、Sendai virus (SeV) および human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、さらには Newcastle disease virus (NDV) 及び HPIV-2 などの弱毒株がある。また、もともと furin 認識配列を有する全臓器向性のウイルス或いは一部の強毒株のウイルスであっても同様に利用でき、強毒株の NDV 及び HPIV-2、或いは HPIV-3、mumps virus、measles virus、canine distemper virus (CDV)、rinderpest virus (RPV)、human respiratory syncytial virus (HRSV) なども本発明の方法が適用できる。更に、パラミクソウイルス科以外のウイルスベクターであっても、例えば、局所感染型の配列 (furin 認識配列なし) であるヒトインフルエンザウイルス A、或いは全臓器向性の配列 (furin 認識配列あり) を有するエイズウイルスを含む多くのウイルスについても適用可能であると考えられる (Nagai Y., Trends Microbiol. 1, 81-87 (1993), Nagai Y. Microbiol Immunol. 39, 1-9 (1995), Klenk HD, Garten W. Trends Microbiol. 2, 39-43 (1994), Lamb, R. A., and D. Kolakofsky. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. p. 1177-1204. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Fields virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. (1996)、ウイルス学, 畑中正一 編集, 東京, 朝倉書店, 247-248 (1997))。例えば furin 認識配列をより効率的な furin 認識配列に置換したり、ウイルス生産細胞で発現する furin 以外のプロテアーゼの認識配列に置換することができる。

#### 【0020】

本発明の方法は、ウイルス増殖に必要なプロテアーゼを、ウイルス生産細胞において十分に供給するのが難しい場合に特に有用である。このような場合としては、例えば該プロテアーゼが、ウイルス生産細胞において内因的に発現していない (または非常に微量しか発現していない) プロテアーゼである場合や、該プロテアーゼが、ウイルス生産細胞にとって有害な作用を及ぼす場合などが考えられる。本発明の方法に従えば、これらのプロテアーゼを本来必要とするウイルスを、該細胞が内因的に発現するプロテアーゼまたは細胞に有害性を低いプロテアーゼを利用して製造することが可能となる。すなわち、ウイルス蛋白質のプロテアーゼ切断部位を、該細胞が内因的に発現するプロテアーゼまたは細胞に有害性の低いプロテアーゼの切断部位に改変したウイルス蛋白質を、細胞において発現させる。この細胞を用いてウイルスを生産させれば、細胞から供給される改変ウイルス蛋白質が形成されるウイルスに取り込まれ、第2のプロテアーゼにより改変ウイルス蛋白質を活性型に変換することができる。従って、もともとのプロテアーゼを必要とせずにウイルスを生産することが可能となる。

#### 【0021】

例えば、ウイルス生産によく用いられる細胞である LLC-MK2 (ATCC CCL-7)、Vero (ATCC CCL-81)、BHK-21 (ATCC CCL-10)、HEK293 (ATCC CRL-1573)、HT1080 (ATCC CCL-121)、HeLa (ATCC CCL-2)、NIH3T3 (ATCC CRL-1658)、3Y1 (JCRB 0734)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL-1651)、CHO (ATCC CRL-9606)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、またはそれらの派生株などが内因的に有意に発現しないプロテアーゼを増殖に必要とするウイルスの生産に、本発明の方法は好適に適用される。特に、ウイルス産生に用いられる哺乳動物細胞に対して毒性を示すプロテアーゼに関して有用性が高い。そのようなプロテアーゼとしては、例えばトリプシン等が挙げられる。トリプシンは、細胞接着を阻害し、さらに血清により不活化するので細胞外で作用させるには血清を含まない培養液を用いなくてはならない。従って、トリプシンを用いた培養条件では細胞の viability は低下してしまう。プロテアーゼが細胞に対して毒性を示すがどうかは、ウイルス産生に必要なプロ



テアーゼ活性を示す条件下において、該プロテアーゼがない場合に比べ細胞のviabilityを低下させるかを検査することにより調べることができる。細胞のviabilityは、例えば酸化還元色素であるレサズリンが生細胞により蛍光産物レゾルフィンに変換されることに基づいたアッセイ法により測定することができる (CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay, Promega)。あるいは、LDH (乳酸脱水素酵素) 活性測定、酸化還元色素のAlamar Blueを用いたアラマブルー蛍光法、またはテトラゾリウム化合物 (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 tetrazolium bromide] やMTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]) の生細胞によるホルマザン産物への変換を利用したMTT法およびMTS法などにより測定することができる。

#### 【0022】

これらのウイルス蛋白質のプロテアーゼ (すなわち本来のプロテアーゼ) の切断部位を、ウイルス生産細胞が内因的に発現するプロテアーゼまたは細胞毒性がより低いプロテアーゼなど (すなわち第2のプロテアーゼ) の切断配列に置換することによって、本来必要なプロテアーゼの非存在下でウイルスを製造することが可能となる。第2のプロテアーゼの切断配列としては、特に制限はないが、例えば上記の哺乳動物細胞 (LLC-MK2, Vero, BHK-21, HEK293, HT1080、またはそれらの派生株) 等が内因的に発現するプロテアーゼの切断配列を用いることが好適である。好ましくは、furinが切断する配列を用いるとよい。furinの発現はユビキタスであり、ほとんどの組織・細胞で発現しているため、furin切断配列に置換することにより、効率的にウイルスを生産することが可能になる。第2のプロテアーゼの切断配列の例としては、furin切断配列 (Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg (Xaaは任意のアミノ酸)) に変換する。具体的には、RTKR, RRRR, RHKR, RQR/KR, RHKR, RKRRなどを例示できる。例えば本来トリプシン等により切断される切断部位 (Xaa-Gln-Ser-Arg や Xaa-Gln-Gly-Arg) を持つウイルス蛋白質を、furin切断配列 (Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg) に変換することにより、この蛋白質をfurinにより開裂され活性型に変換される。

#### 【0023】

Furin切断配列以外にも、所望のプロテアーゼの切断配列に変換することができる (W001/20989)。特に、細胞が内因的に発現しているか、あるいは細胞にとって毒性のすくないプロテアーゼの切断配列に変換することが好ましい。このようなプロテアーゼで開裂される配列を持つウイルス蛋白質遺伝子を用いることにより、細胞のviabilityを維持し、より効率的にウイルスを生産させることができる。エンベロープ蛋白質の開裂のためには、細胞外に分泌されるプロテアーゼや、膜表面に発現する膜型プロテアーゼなどが好適である。また、蛋白質が細胞内において翻訳されて細胞表面に分泌されるまでの輸送経路上に存在するプロテアーゼであってよい。

#### 【0024】

furin以外のプロテアーゼの切断配列としては、例えばMMP及びcollagenaseに特異的な配列である、PLGMTS (配列番号：1) 及び PQGMTS (配列番号：2) の配列が利用できる (特願2002-129351)。この場合、MMP及びcollagenaseによる切断は、認識配列の3残基目のC末端で生じ、例えばセンダイウイルスのF蛋白においてF1蛋白のN末端にMTSが付加された形で、F蛋白の活性を有することが確認されている。また、SeVのF蛋白においてトリプシンにより認識されるR116がIに変換された変異株は、キモトリプシン (chymotrypsin) 或いはエラスターゼ (elastase) によって活性化されることが明らかになっており (Tashiro M et al., J Gen Virol. 73 (Pt 6): 1575-9 (1992), Itoh M, Homma M. J Gen Virol. 69 (Pt 11): 2907-11 (1988))、この配列も利用可能である。chymotrypsin或いはelastaseは Y, F, W, L, I などの疎水性アミノ酸のC末端で切断するので、I以外の配列、則ちY, F, W, Lへの変異も可能であると考えられる。

#### 【0025】

ウイルス生産細胞は、第2のプロテアーゼを高発現するものが好ましい。例えば、ウイルス生産細胞には、改変ウイルス蛋白質を開裂させる第2のプロテアーゼを外来的に発現させることもできる。第2のプロテアーゼを高発現させることで、改変ウイルス蛋白質の

開裂を促進し、ウイルス生産の効率をさらに向上し得る。このためには、第2のプロテアーゼをコードする発現ベクターをこの細胞に導入する。第2のプロテアーゼの発現に用いられるプロモーターは、哺乳動物細胞で遺伝子を発現させるための所望のプロモーターを用いることができる。また、組み換え酵素標的配列を用いて、刺激に応じて第2のプロテアーゼの発現が誘導されるように構築するとよい（後述）。

#### 【0026】

第2のプロテアーゼの一例をさらに示せば、例えばカルパイン、ユビキチン・プロテアソームシステム、ネプリライシン、MMP、セリンプロテアーゼ、アミノペプチターゼ等が挙げられる。カルパインはカルシウムとの結合によって活性化されるプロテアーゼで、その切断配列としては、alpha-アクチニン、トロポニン、コネクチンなどの蛋白質の切断部位を利用することができる。カルパインの切断配列 (Karlsson, J.O. et al. (2000) *Cell Biol. Int.* 24, 235-243) としては、例えば Leu-Leu-Val-Tyr が用いられる。

#### 【0027】

また、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) を分解するMMPおよび近縁遺伝子ファミリーのADAM (a disintegrin and metalloproteinase) の切断配列を用いてもよい。軟骨プロテオグリカン (アグリカン) の分解に必須のADAMTS (ADAM with thrombospondin motif) が分解するaggricanの切断配列は知られている (Tortorella, M.D. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 18566-18573)。これらのプロテアーゼの認識配列を用いることにより、該プロテアーゼを用いてウイルスベクターを製造することができる。

#### 【0028】

また、ECM分解性セリンプロテアーゼとしては、カテプシンG、エラスターゼ、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーター (plasminogen activator; PA)、腫瘍トリプシン、キモトリプシン様中性プロテイナーゼ、トロンビンなどが挙げられる。プラスミンは、生体内で不活性な状態で存在するプラスミノゲンが限定分解されて生じる。PAには、血液凝固に関する組織型PA (tPA) と、ECM分解に関するウロキナーゼ型PA (uPA) とがある (Blasi, F. and Verde, P. *Semin. Cancer Biol.* 1:117-126, 1990)。uPA, tPAの切断配列についてはよく知られている (Rijken, D.C. et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2920-2925; Wallen, P. et al. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 719, 318-328; Tate, K.M. et al. (1987) *Biochemistry* 26, 338-343)。一般に用いられているsubstrate配列はVGR (Dooijewaard, G., and KLUFT, C. (1983) *Adv. Exp. Med. Biol.* 156, 115-120) と、Substrate S-2288 (Ile-Pro-Arg) (Matsuo, O. et al. (1983) *Jpn. J. Physiol.* 33, 1031-1037) である。Butenasは54種類の蛍光基質を用いて、tPAに対する特異性の高い配列を提示し (Butenas, S. et al. (1997) *Biochemistry* 36, 2123-2131)、FPR, VPRが高いtPAに対する分解活性を示した。従って、これらの配列は特に好適に用いられる。プラスミンはフィブロネクチン、テネイシン、ラミニンなどを分解する。

#### 【0029】

また、システインプロテアーゼまたはアスパルティックプロテアーゼに分類されるECM分解酵素も知られている。具体的には、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、コラーゲン、プロコラゲナーゼ (分解により活性化する) 等を基質とするカテプシンB (Sloane, B.F., *Semin. Cancer Biol.* 1:137-152, 1990)、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスターゼ (活性化) 等を基質とするカテプシンL (Kane, S.E. and Gottesman, M.M., *Semin. Cancer Biol.* 1:127-136, 1990)、並びに、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、カテプシンBおよびL (活性化) を基質とするカテプシンD (Rocheffort, H., *Semin. Cancer Biol.* 1:153-160, 1990) などが挙げられる。

#### 【0030】

メタロプロテアーゼ (metalloproteinase) はZnなどの金属元素を含む金属酵素であり、カスパーゼ、アミノペプチダーゼ、アンギオテンシンI変換酵素、コラゲナーゼなどが報告されている。ECMを分解するメタロプロテアーゼとしては、16種類以上のマトリックスメタロプロテアーゼ (matrtix metalloproteinase; MMP) が報告されている。代表的な

MMPとしては、コラゲナーゼ-1、2、3 (MMP-1、8、13)、ゼラチナーゼA、B (MMP-2、9)、ストロメライシン1、2、3 (MMP-3、10、11)、マトリライシン (MMP-7)、膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP、MT2-MMP) などが挙げられる。他に、ECM分解性のメタロプロテアーゼとしては、アミノペプチダーゼが挙げられ、例えばECM構成蛋白質などを分解するアミノペプチダーゼN/CD13およびアミノペプチダーゼBなどが含まれる。

#### 【0031】

その中でコラゲナーゼ (collagenase) (MMP-1, 8, 13) は、線維性コラーゲンであるI, II, III型コラーゲン分子を特異的部位で切断する。ゼラチナーゼ (gelatinase) は、ゼラチナーゼA (MMP-2) およびゼラチナーゼB (MMP-9) の2つのタイプが知られている。ゼラチナーゼはIV型コラゲナーゼともよばれ、基底膜の主成分であるIV型コラーゲンを分解するが、V型コラーゲンおよびエラスチンも分解する。また、MMP-2はI型コラーゲンをMMP-1と同じ部位で切断することが知られている。MMP-9はラミニンおよびフィブロネクチンを分解しないが、MMP-2はこれらを分解する。ストロメライシン (stromelysin) (MMP-3, 10) は広い基質性を有し、プロテオグリカン、III、IV、IX型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどを分解する。マトリライシン (matrilysin) (MMP-7) は、ヘモペキシンドメインをもたない分子であり、基質特異性はMMP-3と共通し、特にプロテオグリカンおよびエラスチンに対する分解活性が高い。膜型メタロプロテアーゼ (membrane-type MMP; MT-MMP) (MT1, 2, 3, 4, 5, 6-MMP) は膜貫通構造をもつMMPである。MT-MMPは、プロペプチドドメインと活性部位の間に挿入配列 (約10アミノ酸) を有する。この挿入配列は Arg-Xaa-Lys-Arg (Xaaは任意のアミノ酸) を含み、細胞膜上に輸送される過程で、細胞内プロセッシングにより開裂され活性化される。MT-MMPとしては、MT1-MMP (MMP-14)、MT2-MMP (MMP-15)、MT3-MMP (MMP-16)、MT4-MMP (MMP-17)、MT5-MMP (MMP-23)、および MT-6-MMP (MMP-25) などが知られ、例えばMT1-MMPはI, II, III型コラーゲンを、MT3-MMPはIII型コラーゲンを分解する。

#### 【0032】

MMPの切断基質は、多数知られている。MMP全般を分解する基質配列としてPLGLWAR (配列番号: 3) (Bickett, D.M. et al. (1993) Anal. Biochem. 212, 58-64)、GPLGMRGL (配列番号: 4) (Deng, S.J. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 31422-31427)、PQGLEAK (配列番号: 5) (Beekman, B. et al. (1996) FEBS Lett. 390, 221-225)、RPKPVEWREAK (配列番号: 6) (Beekman, B. et al. (1997) FEBS Lett. 418, 305-309)、PLALWAR (配列番号: 7) (Jacobsen, E.J. et al. (1999) J. Med. Chem. 42, 1525-1536) がある。MMP-2, 9の分解基質としてPLGMWS (配列番号: 8) (Netzel-Arnett, S. et al. (1991) Anal. Biochem. 195, 86-92) とPLGLG (配列番号: 9) (Weingarten, H. et al. (1985) Biochemistry 24, 6730-6734) がある。

#### 【0033】

最近、phage-displayed peptide library screening によって、MMP9 (Kridel, S.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 20572-20578), MMP2 (Chen, E.I. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 4485-4491), MT1-MMP (Kridel, S.J. et al. (2002) J. Biol. Chem. In JBC Papers in Press, April 16, 2002, Manuscript M111574200) に対する分解基質配列が明らかにされている。これらの論文で、特定されたアミノ酸配列を3つのMMPに対する分解能の有無によって4つのグループに分類されている。Group IVがMT1-MMPに特異的に分解される配列で、Argのない配列としてVFSIPL (配列番号: 10), IKYHS (配列番号: 11) の配列がMMP9, MMP2で分解できずMT-MMPでのみ分解できる基質としてしめされている。

#### 【0034】

例えば、MMP9の切断配列としては、Pro-X-X-Hy (Xは任意の残基, Hyは疎水性残基を表す) が挙げられ、特にPro-X-X-Hy-(Ser/Thr) が好ましい。より具体的には、Pro-Arg-(Ser/Thr)-Hy-(Ser/Thr) が例示できる (X-Hy間で切断が起きる)。Hy (疎水性残基) としては、これらに限定されないが、例えばLeu, Val, Tyr, Ile, Phe, Trp, Metが挙げられる。あるいは、これ以外の切断配列も同定されており (例えば以下の文献のGroup I, II, I

IIA, IIIB を参照; Kridel, S.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 20572-20578)、これらの所望の配列を用いることができる。またMMP2に関しても上記のPro-X-X-Hyであってよく、他にも、(Ile/Leu)-X-X-Hy、Hy-Ser-X-Leu、His-X-X-Hyなどが例示できる(例えば以下の文献のGroup I, II, III, IV を参照; Chen, E.I. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 4485-4491)。MMP-7、MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-3、MT1-MMP (MMP-14) を含むMPファミリーの切断配列は、例えば天然の基質蛋白質の配列を参考にしたり、あるいはペプチドライブラリーのスクリーニング等によって適宜選択することができる(Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19, 661-667 (2001); Woessner, J.F. and Nagase, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. (Oxford University Press, Oxford, UK, 2000); Fernandez-Patron, C. et al., Circ. Res. 85: 906-911, 1999; Nakamura, H. et al., J. Biol. Chem. 275: 38885-38890, 2000; McQuibban, G.A. et al., Science 289: 1202-1206, 2000; Sasaki, T. et al., J. Biol. Chem. 272: 9237-9243, 1997)。例えば切断部位の8アミノ酸 P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' (P1-P1'間で切断される)を例示すれば、MMP-1は VPMS-MRGG (配列番号:12)、MMP-3は RPFS-MIMG (配列番号:13)、MMP-7はVPLS-LTMG (配列番号:14)、MT1-MMPはIPES-LRAG (配列番号:15)などが挙げられるがこれらに制限されない。MMP-8には例えばPLAYWAR (配列番号:16) (Nezel-Amett, S. et al., Anal. Biochem. 195: 86, 1991)が挙げられる。MMPの合成基質は様々なものが入手可能であり、これらの配列を比較することもできる(例えば Calbiochem 登録商標 カタログ, Merk, の各 MMP Substrate 参照)。

#### 【0035】

ウイルス蛋白質のプロテアーゼ切断部位の配列を、上記のプロテアーゼの切断配列に置換することにより、ウイルス蛋白質を開裂するプロテアーゼを変換する。改変ウイルス蛋白質が第2のプロテアーゼで効率的に切断されるかは、この改変蛋白質を細胞で発現させウェスタンブロッティングにより調べることができる。また、開裂して活性化したウイルス蛋白質の機能を検出して確認することができる(PCT/JP03/05528)。例えば細胞膜融合作用を有するウイルス蛋白質であれば、改変ウイルス蛋白質を発現するプラスミドベクターを細胞にトランスフェクションし、第2のプロテアーゼ存在下で培養してシンシチウム形成を検出する。これを測定することにより改変ウイルス蛋白質が第2のプロテアーゼにより開裂して活性化されることを確認することができる。

#### 【0036】

本発明において製造されるウイルスは、ウイルスゲノムに切断部位が改変された蛋白質はコードされていない。そのようなウイルスの一つとしては、切断配列が改変される前の元々の切断配列を持つウイルス蛋白質をコードする遺伝子を持つウイルスが挙げられる。すなわち、このウイルスは改変ウイルス蛋白質を含んでいるが、ウイルスゲノムには野生型切断配列を持つウイルス蛋白質をコードする遺伝子を保持している。従ってウイルスは、(もしウイルス増殖に必要なウイルス遺伝子を持っていれば、)野生型切断配列を切断するプロテアーゼに依存的に増殖する。野生型の切断配列を持つウイルス遺伝子を持つウイルスを製造する際には、第2のプロテアーゼ存在下でウイルス生産細胞において改変ウイルス蛋白質を発現させるのに加え、野生型切断配列を切断するプロテアーゼ(すなわち元来のプロテアーゼ)をウイルス生産細胞に添加または発現させてもよい。改変ウイルス蛋白質を用いることにより、ウイルス生産量を上昇させることが期待できる(実施例5参照)。

#### 【0037】

本発明の他の一態様においては、製造されるウイルスは、切断配列を改変する対象となるウイルス遺伝子が欠損する欠損型ウイルスである。このウイルスは当該ウイルス遺伝子を欠損するため、ウイルスが標的細胞に感染しても、その細胞において機能的ウイルス蛋白質を発現することができず、(プロテアーゼのあるなしに関わらず)増殖することができない。すなわち、このウイルスは非伝播性となる。本発明に方法は、特に、高力価のベクター生産が一般に難しい、伝播能を有さない欠損型ベクターの効率的な製造を、ヒト細胞を含む様々な細胞種を用いて可能にする利点を有する。

## 【0038】

本発明のウイルス製造においては、上記のように切断部位を第2のプロテアーゼ切断配列に変換した改変ウイルス蛋白質をトランスに（すなわちウイルスゲノム以外から）供給する。このために、改変ウイルス蛋白質を発現するベクターを別途構築し、ウイルス生産細胞に導入して発現させることが好ましい。改変ウイルス蛋白質を発現するためのベクターは所望のベクターを用いてよいが、もしウイルスベクターを用いる場合は、当然のことながら、製造したいウイルスと混ざり合わないよう、ウイルス生産細胞において増殖しないウイルスベクターを使用するようにする。例えば、増殖能を不活化したウイルスベクター、製造するウイルスとは別種の非伝播性ウイルスベクター、または非ウイルスベクターを使用することが好ましい。具体的には、複製能を欠損した異種ウイルスベクターや、プラスミドベクターが好適である。

## 【0039】

改変ウイルス蛋白質を発現させるためのより好ましいベクターとしてはプラスミドベクターが挙げられる。プラスミドの細胞へのトランスフェクションには、例えばリン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)、または種々のトランスフェクション試薬を用いた方法、あるいは電気穿孔法等を用いることができる。リン酸カルシウム法については、例えばChenおよびOkayama (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745) に従って、2~4% CO<sub>2</sub>、35℃、15~24時間、沈殿混液中のDNA濃度 20~30 microg/ml の条件で実施することができる。トランスフェクション試薬については、DEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W.  $5 \times 10^5$ )、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169)、TransIT-LT1 (Mirus, Product No. MIR 2300) などを用いることができる。トランスフェクション試薬とDNAとの複合体がエンドソーム中で分解されてしまうのを防ぐため、クロロキンを加えることができる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。また、電気穿孔法は、細胞選択性がないという点で汎用性が高く、パルス電流の持続時間、パルスの形、電界（電極間のギャップ、電圧）の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度を最適化して適用される。ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができる点で、トランスフェクション試薬を用いる方法が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169)、またはTransIT-LT1 (Mirus, Product No. MIR 2300) 等が用いられるが、これらに制限されない。

## 【0040】

改変蛋白質を発現させるために用いるプロモーターとしては、哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができ、例えばサイトメガロウイルス (CMV) のプロモーター、ラウスサルコーマウイルス (RSV) LTRプロモーター、チミジンキナーゼ (TK) プロモーター、 $\alpha$ -または $\beta$ -アクチンのプロモーター、SV40初期遺伝子プロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、またはこれらのハイブリッドプロモーター等が利用できる (Kim DW et al., 1990, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene 91(2):217-23; Chapman BS et al., 1991, Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells, Nucleic Acids Res. 14: 3979-3986; Takebe Y et al., 1988, SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Mol. Cell Biol. 1: 466-472)。

## 【0041】

改変蛋白質を発現させるために用いる特に好ましいプロモーターとしては、サイトメガロウイルスエンハンサーおよびニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターを含むプロモーター (CAプロモーターと称す) が挙げられる。CAプロモーターとは、(i) サイトメガロウイルス

(CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のエンハンサー配列、および (ii) ニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子プロモーター配列を含むハイブリッドプロモーターを言う。CAプロモーターを用いて改変ウイルス蛋白質を発現させることで、高力価のウイルス生産が可能となる。CMV IEエンハンサーとしては、所望のCMV株のimmediately early遺伝子のエンハンサーを用いることができるが、例えば配列番号: 17の塩基配列を含むDNAを例示することができる。

#### 【0042】

また、ニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターとしては、ニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子のゲノムDNAの転写開始部位およびTATAボックス (Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383, 1981) およびCCAATボックス (Nucl. Acids Res. 8, 127-142, 1980) を含むDNA断片であって、プロモーター活性を持つ断片を使用することができる。ニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子プロモーターの塩基配列については、例えば T.A.Kostらによって報告されている (Nucl. Acids Res. 11, 8287-8286, 1983)。ニワトリの  $\beta$ -アクチンプロモーターにおいては、本来の  $\beta$ -アクチン構造遺伝子の翻訳開始コドン (ATG) の上流-909の位置のG (グアニン) から-7の位置のG (グアニン) までの領域はイントロンと考えられる。このイントロンには転写を促進する活性があるため、このイントロンの少なくとも一部までを含むゲノムDNA断片を用いることが好ましい。このようなニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターとしては、具体的には、例えば配列番号: 18の塩基配列を含むDNAを例示することができる。イントロンのアクセプター配列は、適宜他の遺伝子の配列を使うことができ、例えばウサギ  $\beta$ -グロビンのスプライシングアクセプター配列を用いてよい。より具体的には、ウサギ  $\beta$ -グロビンの開始コドンの直前にある第2イントロンのアクセプター部位を用いることができる。具体的には、配列番号: 19に記載の塩基配列を含むDNAを例示することができる。本発明においてCAプロモーターとしては、CMV IEエンハンサー配列の下流に、イントロンの一部までを含むニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターを連結し、その下流に所望のイントロンアクセプター配列を付加したDNAが好適である。一例を配列番号: 20に示した。蛋白質発現のためには、この配列の最後のATGを開始コドンとして、改変ウイルス蛋白質のコード配列を付加すればよい。

#### 【0043】

CAプロモーターに用いるCMVエンハンサー配列およびニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子プロモーターは、単離株または単離個体によって配列に多様性があり得る。また、これらの配列は、制限酵素認識部位を追加または削除したり、リンカー配列を挿入したりするために、軽微に改変し得る (Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd ed., Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。すなわち、これらの配列は、配列番号: 20に例示したのと全く同一の配列でなくても、同等またはそれ以上のプロモーター活性を有する限り、適宜使用することができる。CMVエンハンサー配列およびニワトリ  $\beta$ -アクチン遺伝子プロモーター配列のバリエーションとしては、例えば Genbank accession AF334827、AY237157、AJ575208、および X00182 等に記載の配列を用いることができる。これらの配列からCAプロモーターの構築に必要な配列を特定するには、配列番号: 17および18とアライメントを作成し、該当する領域を選択すればよい。また、CAプロモーターの構築には、pCAGGS (Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199、特開平3-168087) や pCALNDLw (Arai, T. et al. J. Virology 72, 1998, p1115-1121) からDNAを切り出して利用することができる。

#### 【0044】

上記のようなCMV IEエンハンサー配列およびニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターのバリエーションとしては、配列番号: 17に記載のCMV IEエンハンサー配列、および配列番号: 18に例示されたニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターにおいて、30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、より好ましくは3%以下の塩基を置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含み、同等のプロモーター活性を示す配列が挙げられる。これらの配列は、それぞれ配列番号: 17に記載の塩基配列、または配列番号: 18に記載の塩基配列と高いホモロジーを示す。高いホモロジー



としては、例えば70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上の同一性を有する塩基配列である。塩基配列の同一性は、例えばBLASTNプログラム (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) を用いて決定することができる。例えばNCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば配列番号:17に記載の塩基配列全体または配列番号:18に記載の塩基配列全体に対する同一性の値を計算する。具体的には、アライメントにおけるこれらの配列数 (ギャップを含む) における一致する塩基数の割合を計算する。

#### 【0045】

また、CMVエンハンサー配列およびニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター配列は、CMVのゲノム核酸およびニワトリcDNAからハイブリダイゼーションによって単離することができる。本発明において使用されるCMVエンハンサーおよびニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターは、それぞれ配列番号:17に記載の塩基配列、または配列番号:18に記載の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであって、これらと同等のプロモーター活性を有するDNAであってもよい。ハイブリダイゼーションにおいては、例えば配列番号:17に記載の塩基配列、配列番号:18に記載の塩基配列、またはそれらの相補配列を含む核酸からプローブを調製、またはハイブリダイズの対象とするDNAからプローブを調製し、それが他方のDNAにハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC、7%(W/V) SDS、100 micro-g/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液 (1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む) を含む溶液中、60℃、好ましくは65℃、より好ましくは68℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC中、好ましくは1xSSC中、より好ましくは0.5xSSC中、より好ましくは0.1xSSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

#### 【0046】

改変ウイルス蛋白質を発現するためのベクターにおいて、特定の刺激に応答して発現を誘導できるプロモーターを用いると、ウイルス生産時に特異的に改変ウイルス蛋白質の発現を誘導することができる。ウイルス蛋白質は細胞に対して毒性を示すことがあるため、このような誘導発現系を用いることに利点がある。この目的のためには、例えば大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンを利用した系 (Gossen, M., et al. (1995) Science 268: 1766-1769; Tet Expression Systems and Cell Lines(July 1996) CLONTECHniques XI(3):2-5)、エクダイソン受容体、RXRおよびエクダイソン受容体応答配列を利用したエクダイソン誘導発現系 (pVgRXR, pIND; Ecdysone-inducible Mammalian Expression Kit, Invitrogen社)、あるいはCre/loxPまたはFLP/FRT等の配列特異的組み換え酵素を利用した系を利用することができる。特に、配列特異的組み換え酵素を利用した誘導発現系は、さまざまなプロモーターと組み合わせて用いることが容易で、非常に厳格に発現のon/offを制御することが可能であるため、改変ウイルス蛋白質の発現系に利用するために適している。

#### 【0047】

CreはバクテリオファージP1が持つ約38 kDaのcyclizationリコンビナーゼであり、loxP部位の間を特異的に組み換える (Sauer B, Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci USA 85:5166-70; Sternberg N, Hamilton D. 1981. Bacteriophage P1 site

-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 150:467-86; Brian Sauer, Methods of Enzymology; 1993, Vol. 225, 890-900; Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26:99-109)。  
loxPは、8 bpのスペーサーを持つ13 bpのアシメトリックなインバーテッドリピート配列である (ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT; 下線部がインバーテッドリピート)(配列番号: 21)。例えばCre/loxP誘導型発現プラスミドpCALNdlw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) を用いて、Creにより発現を誘導できるベクターを構築することができる。Creを発現させるには、例えばアデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virology 72, 1115-1121 (1998)) により、例えば moi=3~5 で感染させる。

#### 【0048】

FLPリコンビナーゼは酵母*Saccharomyces cerevisiae*の2 micronプラスミドに由来する約49 kDaのflippaseリコンビナーゼで、FLP recombinase target (FRT) 配列を標的として組み換えを起こす (Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH. 1999. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. Nat Biotechnol 17:1091-6; Broach, J. R., Guarascio, V. R. & Jayaram, M. (1982) Cell 29, 227-34; Cox, M. M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4223-227; Vetter, D., Andrews, B. J., Roberts-Beatty, L. & Sadowski, P. D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7284-288; Abremski, K. & Hoess, R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 1509-514; Stark, W. M., Boocock, M. R. & Sherratt, D. J. (1992) Trends Genet. 8, 432-39; Kilby, N. J., Snaith, M. R. & Murray, J. A. H. (1993) Trends Genet. 9, 413-21)。loxPと同様に、FRT配列も8 bpのスペーサーを持つ13 bpのリPEAT配列からなる (GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTC; 配列番号: 22) (Andrews, B. J. et al. (1985). The FLP Recombinase of the 2 Micron Circle DNA of Yeast: Interaction with its Target Sequences. Cell 40, 795-803)。また、標的特異的組み換えは、上記のloxP部位およびFRT部位の変異配列を利用して行うこともできる (Baszczynski, Christopher L. et al, US Patent Application 20040003435)。

#### 【0049】

組み換え酵素依存的に発現が誘導されるベクターを構築するには、組み換え酵素標的配列に挟まれたDNA断片を、プロモーターと改変ウイルス蛋白質コード配列との間に挿入する。この状態では、挿入されたDNA断片に妨げられ、改変ウイルス蛋白質は発現しない。しかし、組み換え酵素を作用させると、標的配列で挟まれたDNAが切り出され、プロモーターから組み換え酵素が発現するようになる。このように、組み換え酵素により、プロモーターからの発現を誘導することができる。組み換え酵素の標的配列に挟まれたDNA中には、転写終結シグナルおよび/または終止コドンを含むようにしておき、組み換え酵素を作用させない時に、下流に連結された遺伝子の発現を確実に阻害できるようにすることが好ましい。また、組み換え酵素の標的配列に挟まれたDNA中には、適宜マーカー遺伝子を挿入しておくことができる。

#### 【0050】

改変ウイルス蛋白質の発現ベクターは、ベクターの種類に応じてトランスフェクションまたは感染など適当な方法により哺乳動物細胞に導入して発現させる。トランスフェクションには、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169)、TransIT-LT1 (Mirus, Product No. MIR 2300) などのカチオン脂質を好適に用いることができる。改変ウイルス蛋白質の発現ベクターは、ウイルス製造時に一過的に導入し、ウイルス生産細胞でエピソーム的に発現させてもよいし、あるいはウイルス生産細胞の染色体中に導入された安定形質転換体を樹立してもよい。改変ウイルス蛋白質の発現ベクターが安定導入された細胞は、ウイルス製造のためのヘルパー細胞として有用である。安定形質転換体は、ベクターに薬剤耐性マーカー遺伝子を組み込んでおき、薬剤耐性株を選択して得ることができる。ウェスタンブロッティングにより改変ウイルス蛋白質を高発現する細胞クローンを単



離することが好ましい。また、実際にウイルスベクターを生産させ、高力価でウイルスを生産する能力を持つ細胞を選択する。

#### 【0051】

改変ウイルス蛋白質の発現ベクターを導入する細胞種は、ウイルス増殖可能な哺乳動物細胞であれば特に制限はない。例えば、マウス、ラット、サル、およびヒト由来の細胞株を用いることができる。具体的には、NIH3T3、3Y1、LLC-MK2、Vero、HeLa、HEK293、COS-1、COS-7、CHO、CHO-K1、HT1080、またはそれらの派生株が挙げられる。ヒト細胞への遺伝子導入のためにウイルスベクターを製造する場合は、ヒト細胞を用いてウイルスを生産することが好ましい。なぜなら、上述のように、ウイルス生産細胞から放出された娘ウイルス粒子には、ウイルス生産細胞由来の細胞質および細胞膜成分が混入し得る。従ってヒト細胞以外の細胞を用いてウイルスを製造すると、これらの成分がヒトにおいて有害作用を及ぼしたり、あるいは免疫反応を惹起する可能性がある。このような問題は、ウイルスベクターを投与する対象と同種の細胞を用いてウイルスを生産することで解決することができる。

#### 【0052】

改変ウイルス蛋白質の発現ベクターを発現可能な細胞株は、該蛋白質が由来するのと同種のウイルスの製造のみならず、他種ウイルスにおいて、該改変ウイルス蛋白質でシールドタイプ化されたウイルスを製造するためにも有用である。例えば、マイナス鎖RNAウイルスの改変F蛋白質およびHN蛋白質の存在下でアデノウイルスを産生し、改変F蛋白質でシールドタイプ化したアデノウイルスベクターを構築することもできる (Galanis, E. et al., Hum. Gene Ther. 12, 811-821 (2001))。更には、例えばレトロウイルスを改変F蛋白質およびHN蛋白でシールドタイプ化する場合に (Spiegel, M. et al., J Virol. 72(6) 5296-5302 (1998))、本細胞を用いることができる。細胞には、製造するウイルスに応じて、さらに別のウイルス蛋白質および/またはウイルスゲノムRNAを発現するベクターを組み込むこともできる。

#### 【0053】

改変ウイルス蛋白質を持つウイルスベクターの製造は、それぞれのウイルスの製造工程において、上記の細胞（および改変ウイルス蛋白質を切断するプロテアーゼ）を用いて行うことで実施することが可能である。具体的には、改変ウイルス蛋白質を発現する細胞において、改変ウイルス蛋白質を切断するプロテアーゼの存在下、ウイルスベクターのゲノムRNAを転写させる。ウイルス粒子の形成に、ウイルス蛋白質をトランスに供給することが必要な場合には、そのウイルス蛋白質も発現させる。転写されたウイルスゲノムRNAは、ウイルス蛋白質を複合体を形成し、改変ウイルス蛋白質が取り込まれたウイルス粒子が形成される。このウイルス粒子を細胞の培養上清または細胞から回収することによって、改変ウイルス蛋白質を含むウイルスベクターを調製することができる。

#### 【0054】

本発明の方法はプロテアーゼ依存的な所望のウイルスベクターの製造に適用することが可能であるが、以下にマイナス鎖RNAウイルスベクターの製造方法について、例示としてさらに詳しく説明する。マイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖（ウイルス蛋白質をセンスにコードする鎖と相補的なアンチセンス鎖）のRNAをゲノムとして含むウイルスのことである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。マイナス鎖RNAウイルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み (integration) は起こらない (Lamb, R. A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。マイナス鎖RNAウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばマイナス鎖RNAウイルスの1つであるセンダイウイルス (SeV) を連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定

に発現する事が示されている (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上のメリットがある。このように、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ヒトの遺伝子治療のための高効率ベクターの新しいクラスとなることが示唆される。

#### 【0055】

本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、特に一本鎖ネガティブ鎖 [すなわちマイナス鎖] RNAをゲノムに有する一本鎖マイナス鎖RNAウイルス (非分節型 (non-segmented) マイナス鎖RNAウイルスとも言う) が挙げられる。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, および Rubulavirus属等を含む)、ラブドウイルス (Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス (Filoviridae)、オルトミクソウイルス (Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス (Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス (Arenaviridae) などの科に属するウイルスが含まれる。

#### 【0056】

より具体的に例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、および Newcastle disease virus (NDV) などが挙げられる。

#### 【0057】

本発明のウイルス製造方法が主な対象とするのは、増殖に必要なプロテアーゼが furin 以外のプロテアーゼであるウイルスであるが、例えば furin 型の切断配列を元来 F 蛋白質に含むウイルスに関しても、F 蛋白質が変異して切断部位が変化している弱毒株を製造する際に、furin 切断型の F 蛋白質をウイルス生産細胞からトランスに供給することが考えられる。

#### 【0058】

マイナス鎖RNAウイルスのF蛋白質の開裂部位を改変する場合は、切断後のF1断片のN末端が野生型F蛋白質のF1断片のN末端と同一となるように切断配列を設計することが好ましい。また効率的な切断反応を起こすために切断部位にリンカーを挿入する場合には、切断後のF1断片のN末端に、野生型F1と比べ最小限のアミノ酸が付加されるように設計することが望ましい。例えば、切断後のN末端には、野生型F1に比べ5アミノ酸以内、好ましくは4アミノ酸以内、より好ましくは3アミノ酸以内 (例えば1、2、または3アミノ酸) が付加されるようにする。もともとのF蛋白質のF2断片のC末端のアミノ酸は適宜欠失させてよく、欠失させるアミノ酸は、例えば挿入するアミノ酸数を同じとするか、0~10アミノ酸程度の範囲で選択することができる。プロテアーゼによる開裂および膜融合の過程が障害されない限り、切断配列の下流にF1のN末端が直接連結するようにF蛋白質を調製することができるが、開裂配列とF1断片は適当なスペーサーを介して連結してもよい。

#### 【0059】

改変F蛋白質を発現させるためのベクターは、所望のベクター系を用いることができるが、好ましくはプラスミドベクターが用いられる。ベクターは、ウイルス産生時に細胞にトランスフェクションしてもよく、あるいは予め細胞の染色体に組み込んだ形質転換細胞を樹立してもよい。改変F蛋白質を発現させるためのプロモーターとしては、哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができるが、好ましくはCAプロモーターを使用する。組み換え酵素標的配列を用いて、組み換え酵素特異的に発現を誘導で

きるようにしておくことが好ましい（実施例9参照）。

#### 【0060】

F蛋白質以外にも、例えば、レオウイルス科のロタウイルス属のウイルスは、virion上のspike蛋白であるVP4蛋白がtrypsinで切断されて活性化されると考えられている（Arias CF, J Virol. 70(9): 5832-9 (1996), Konno T et al., Clin Infect Dis. 16 Suppl 2: S92-7 (1993)）。従って、VP4のtrypsinによる切断部位をfurin 認識配列に変換した改変蛋白質を用いて、本発明に従いロタウイルスを製造することが可能である。

#### 【0061】

本発明において製造されるウイルスは、より好ましくは、パラミクソウイルス亜科（レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む）に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属（genus *Respirovirus*）（パラミクソウイルス属（*Paramyxovirus*）とも言う）に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型（HPIV-1）、ヒトパラインフルエンザウイルス3型（HPIV-3）、ウシパラインフルエンザウイルス3型（BPIV-3）、センドアイウイルス（Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる）、およびサルパラインフルエンザウイルス10型（SPIV-10）などが含まれる。本発明において製造されるウイルスは、最も好ましくはセンドアイウイルスである。ウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来するウイルスであってよい。

#### 【0062】

特にセンドアイウイルスは、齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センドアイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている（Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997; Bitzer, M. et al., J. Gene Med. 5: 543-553, 2003）。センドアイウイルスのこれらの特徴は、センドアイウイルスベクターが人の治療へ応用出来ることを示唆するものである。

#### 【0063】

マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAは、マイナス鎖RNAウイルスのウイルス蛋白質と共にリボヌクレオプロテイン（RNP）を形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、このRNAが複製されて娘RNPが形成される機能を持つRNAである。一般にマイナス鎖RNAウイルスのゲノムは、3'リーダー領域と5'トレイラー領域の間に、ウイルス遺伝子がアンチセンス配列として並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列（E配列）- 介在配列（I配列）- 転写開始配列（S配列）が存在し、これにより各遺伝子のORFをコードするRNAが別々のシストロンとして転写される。ゲノムRNAは、該RNAにコードされる遺伝子群の発現およびRNA自身の自律的な複製に必要なウイルス蛋白質である N（ヌクレオキャプシド（またはヌクレオプロテインとも言う））、P（ホスホ）、およびL（ラージ）をアンチセンスにコードしている。ゲノムRNAは、さらにエンベロープ構成蛋白質をコードしていてもよいが、これらの遺伝子を欠損する欠損型ベクターを構築することもできる。

#### 【0064】

例えばパラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、N遺伝子は"NP"とも表記される。また、HNはノイラミニダーゼ活性を有さない場合にはHと表記される。

レスピロウイルス属	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	N	P/V	M	F	HN	(SH)	L
モルビリウイルス属	N	P/C/V	M	F	H	-	L

#### 【0065】

例えばセンドアイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセス番号は

、N遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV、AF014953; DMV、X75961; HPIV-1、D01070; HPIV-2、M55320; HPIV-3、D10025; Mapuera、X85128; Mumps、D86172; MV、K01711; NDV、AF064091; PDPR、X74443; PDV、X75717; RPV、X68311; SeV、X00087; SV5、M81442; および Tupaia、AF079780、P遺伝子については、CDV、X51869; DMV、Z47758; HPIV-1、M74081; HPIV-3、X04721; HPIV-4a、M55975; HPIV-4b、M55976; Mumps、D86173; MV、M89920; NDV、M20302; PDV、X75960; RPV、X68311; SeV、M30202; SV5、AF052755; および Tupaia、AF079780、C遺伝子については CDV、AF014953; DMV、Z47758; HPIV-1、M74081; HPIV-3、D00047; MV、AB016162; RPV、X68311; SeV、AB005796; および Tupaia、AF079780、M遺伝子については CDV、M12669; DMV Z30087; HPIV-1、S38067; HPIV-2、M62734; HPIV-3、D00130; HPIV-4a、D10241; HPIV-4b、D10242; Mumps、D86171; MV、AB012948; NDV、AF089819; PDPR、Z47977; PDV、X75717; RPV、M34018; SeV、U31956; および SV5、M32248、F遺伝子については CDV、M21849; DMV、AJ224704; HPN-1、M22347; HPIV-2、M60182; HPIV-3、X05303、HPIV-4a、D49821; HPIV-4b、D49822; Mumps、D86169; MV、AB003178; NDV、AF048763; PDPR、Z37017; PDV、AJ224706; RPV、M21514; SeV、D17334; および SV5、AB021962、HN (HまたはG) 遺伝子については CDV、AF112189; DMV、AJ224705; HPIV-1、U709498; HPIV-2、D000865; HPIV-3、AB012132; HPIV-4A、M34033; HPIV-4B、AB006954; Mumps、X99040; MV、K01711; NDV、AF204872; PDPR、Z81358; PDV、Z36979; RPV、AF132934; SeV、U06433; および SV-5、S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

#### 【0066】

一般に N、P、およびL遺伝子を保持しているマイナス鎖RNAウイルスベクターは、細胞内で自律的にRNAゲノムからウイルス遺伝子が発現し、ゲノムRNAが複製される。さらにエンベロープ構成蛋白質の存在下で感染性のウイルス粒子が形成されて細胞外に放出される。感染性ウイルス粒子の形成に必要なエンベロープ構成蛋白質をコードする遺伝子がゲノムに搭載されていれば、このウイルスベクターは自律的に増殖することができ、伝播能を有するウイルスベクターとなる。エンベロープ構成蛋白質遺伝子のいずれか、あるいはそのすべてをゲノムから欠損するウイルスベクターは、感染細胞において感染性ウイルス粒子を欠損できない欠損型ウイルスベクターとなる。

#### 【0067】

エンベロープ構成蛋白質とは、ウイルスのエンベロープの成分となるウイルス蛋白質を言い、エンベロープ表面に露出し細胞への接着または感染に機能するスパイク蛋白質およびエンベロープの形成等に機能する裏打ち蛋白質が含まれる。具体的には、エンベロープ構成蛋白質の遺伝子としては F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ) (またはH (ヘマグルチニン))、およびM (マトリックス) が挙げられ、ウイルス種によっては H、M1、および G 等の遺伝子を持つ。スパイク蛋白質であるF遺伝子欠損またはHN (またはH) 遺伝子欠損は、マイナス鎖RNAウイルスベクターを非伝播性にするために有効であり、エンベロープの裏打ち蛋白質であるM遺伝子欠損は感染細胞からの粒子形成を不能にするために有効である (W000/70055、W000/70070、および W003/025570; Li, H. -O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000); Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。また、F、HN (またはH)、およびMの少なくとも2つの遺伝子の任意の組み合わせを欠損するベクターは、より安全性が保障される。遺伝子を欠損させるには、変異導入 (W000/09700) により蛋白質の機能を喪失させたり、蛋白質のコ

ード配列を除去することにより遺伝子を欠失させる。例えば、MおよびF遺伝子両欠損マイナス鎖RNAウイルス ( $\Delta M\Delta F$ ) は、非伝播性でかつ粒子形成を欠くベクターとなる。 $\Delta M\Delta F$ ウイルスは、*in vitro*および*in vivo*で高レベルの感染性および遺伝子発現能を保っており、そのレベルは野生型ウイルスと同等である。 $\Delta M\Delta F$ ウイルスは、マイナス鎖RNAウイルスベクターの安全性の向上にさらに寄与するものと考えられる。エンベロープ構成蛋白質遺伝子を欠損するウイルスは、改変F蛋白質に加え、欠損する蛋白質を共発現する哺乳動物細胞を用いて構築することができる。ある種の細胞では感染にHN蛋白質は必要なく (Markwell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4):978-982 (1985))、F蛋白質のみで感染が成立する。このような細胞への遺伝子導入のためのウイルスベクター作製には、改変F蛋白質のみを供給すればよい。

#### 【0068】

また、欠損型ウイルスを作製する場合は、ウイルスゲノムが欠損するエンベロープ蛋白質遺伝子とは異なる種類のエンベロープ蛋白質を用いてシュードタイプ化したウイルスベクターを製造することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベースとなるウイルスのゲノムが元来コードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有する組み換えウイルスを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。細胞への感染能を与える所望の蛋白質が用いられる。例えば、他のウイルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus; VSV) のG蛋白質 (VSV-G) を挙げることができる。VSV-G蛋白質は、任意のVSV株に由来するものであってよい。例えば Indiana血清型株 (J. Virology 39: 519-528 (1981)) 由来のVSV-G蛋白質を用いることができるが、これに限定されない。また本発明のベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質を任意に組み合わせることもできる。例えば、このような蛋白質として、ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適である。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質などが挙げられる。レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス (MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用い得る。また、MuMLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる (例えばpCL-10A1(Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)))。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。これらの蛋白質は、細胞外ドメインをF蛋白質またはHN蛋白質の細胞内ドメインと結合させた融合蛋白質として用いてもよい。このように本発明においては、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターを製造することも可能である。ウイルスのゲノムRNAにはこれらのエンベロープ蛋白質をゲノムにコードされないように設計すれば、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

#### 【0069】

また、プロテアーゼ切断配列を改変した改変F蛋白質において、切断部位以外に、他の部位にも改変を加えることもできる。例えば、F蛋白質の細胞質ドメインの欠失により細胞融合能が高めることが可能である (PCT/JP03/05528)。例えば、細胞質ドメインに0個~28個、より好ましくは1~27個、より好ましくは4~27個のアミノ酸を有するように、細胞質ドメインの一部のアミノ酸を欠失させたF蛋白質は、野生型F蛋白質に比べ有意に高い細胞融合能を示す。細胞質ドメインとは、膜蛋白質の細胞質側のドメインであり、F蛋白質においては膜貫通(TM)領域のC末側領域である。例えば、細胞質ドメインとして6~20個、より好ましくは10~16個、より好ましくは13~15個のアミノ酸を有するF蛋白質を持つウイルスベクターを調製すれば、野生型F蛋白質を用いるよりも高い細胞融合能を持つベクターを得ることができる。

#### 【0070】

また、2種のスパイク蛋白質の融合蛋白質を持つウイルスを構築してもよい。細胞融合を機能するF蛋白質と、細胞への接着に機能すると考えられるHN蛋白質（またはH蛋白質）を融合蛋白質として発現させると、別々に発現させる場合に比べ非常に強い融合能を発揮することができる（PCT/JP03/05528）。この融合蛋白質は、互いの細胞質ドメインの部分で両者の蛋白質が結合された蛋白質である。具体的には、融合蛋白質のN末端側にF蛋白質を、C末端側にHN（またはH）蛋白質を含んでいる。両者の蛋白質を融合させる場合、全長蛋白質同士を融合させてもよいが、F蛋白質の細胞質ドメインの一部または全部を欠失させた蛋白質をHN（またはH）蛋白質に融合させてもよい。

#### 【0071】

またマイナス鎖RNAウイルスベクターは、アクセサリ遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリ遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する（Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179）。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性のない遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

#### 【0072】

マイナス鎖RNAウイルスベクターの製造方法は、具体的には、(a) (i) F蛋白質のプロテアーゼ切断配列を他のプロテアーゼの切断配列に改変した改変ウイルス蛋白質、(ii) 該他のプロテアーゼ、および(iii) マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを含むRNPを構成する蛋白質の存在下で、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAまたはその相補鎖を哺乳動物細胞において転写させる工程、および(b) 生成したウイルスを回収する工程、を含む方法である。ここで、ゲノムRNAは、該改変ウイルス蛋白質をコードしていない。マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAまたはその相補鎖（アンチゲノムRNA）は、マイナス鎖RNAウイルスのRNPを構成するウイルス蛋白質と共にRNPを形成し、ゲノムにコードされるウイルス蛋白質を発現すると共に、細胞内でゲノムRNA-アンチゲノムRNAを増幅させ、ウイルス粒子を形成する。これを回収することによって、ウイルスを得ることができる。

#### 【0073】

RNPを構成するウイルス蛋白質とは、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAと複合体を形成し、ゲノムRNAの複製およびゲノムにコードされている遺伝子の発現に必要なウイルス蛋白質群をいい、具体的には、N（ヌクレオキャプシド（またはヌクレオプロテイン（NP）とも言う））、P（ホスホ）、およびL（ラージ）蛋白質である。ウイルス種によっては、表記は異なることもあるが、対応する蛋白質は当業者にとっては自明である（Anjeanette Robert et al., Virology 247:1-6 (1998)）。ウイルス種によっては、表記は異なることもあるが、対応する蛋白質は当業者であれば容易に特定できる。マイナス鎖ゲノムの転写は、ゲノムと同じマイナス鎖を転写させてもよく、あるいはプラス鎖（アンチゲノム。ゲノムRNAの相補鎖。）を転写させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはプラス鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。このためには、転写産物の5'端に自己切断型のリボザイムを付加しておき、リボザイムによりマイナス鎖RNAウイルスゲノムの末端を正確に切り出させることにより実現させることができる（Ken-ichi Inoue et al. J. Virol. Methods 107, 2003, 229-236）。あるいは、他の態様においては、転写産物の5'端を正確に制御するために、転写開始部位としてバクテリオファージのRNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させる。バクテリオファージのRNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌T3ファージおよびT7ファージ、およびサルモネラSP6ファージ等が用いられる（Krieg, P.A. and Melton, D.A. 1987. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. Methods Enzymol. 155: 397-15; Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. Nucleic Acids Res. 15: 8783-798; Pokrovskaya, I.D. a



nd Gurevich, V.V. 1994. In vitro transcription: Preparative RNA yields in analytical scale reactions. Anal.Biochem. 220: 420-23)。バクテリオファージのRNAポリメラーゼの発現は、例えばこれを発現するワクシニアウイルス (Fuerst, T.R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 8122-8126(1986)) を用いることができるし、あるいはプラスミドなどの非ウイルスベクターから発現させることもできる (実施例参照)。ウイルス生産細胞の染色体に組み込んで、バクテリオファージのRNAポリメラーゼを誘導発現できる細胞株を樹立することも好適である。プロモーターとしては、上記に例示した哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができるが、好ましくはCAプロモーターを使用する。

#### 【0074】

転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。リボザイムとしては、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイムが使用できる。

#### 【0075】

ウイルスゲノムは所望の外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子を含む組換えウイルスベクターは、ウイルスベクターのゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる (Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。外来遺伝子の挿入位置は、例えばウイルスゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位を選択することができ、例えばゲノムRNAの3'リーダー領域と3'端に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'端に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。また、FまたはHN遺伝子などを欠失するゲノムでは、その欠失領域に外来遺伝子をコードする核酸を挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入することが望ましい (Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virology 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。挿入した外来遺伝子とウイルスORFの間には、E-I-S配列が構成されるようにする (Tokusumi, T. et al. (2002) Virus Res 86(1-2), 33-8)。E-I-S配列を介して2またはそれ以上の外来遺伝子をタンデムに並べて挿入することができる。

#### 【0076】

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、ゲノムRNAをコードするcDNA中に外来遺伝子を挿入するためのクローニングサイトを設計することができる。その部位は、例えばゲノムの蛋白質非コード領域の所望の位置であってよく、具体的には3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。エンベロープ構成蛋白質遺伝子を欠失するゲノムでは、その欠失領域にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。

#### 【0077】

ベクターに搭載する外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子上流 (マイナス鎖 (ネガティブ鎖) の3'側) に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (WO01/8223)。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、マイナス鎖の3'の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5'の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。

#### 【0078】

外来遺伝子をコードする核酸をゲノムに挿入するときに付加するS配列としては、例えばマイナス鎖RNAウイルスの所望のS配列を用いることができるが、センダイウイルスであれば、3'-UCCCVUUWC-5' (W= AまたはC; V= A, C, またはG) (配列番号: 23) の配列を好適に用いることができる。特に 3'-UCCCAGUUUC-5' (配列番号: 24)、3'-UCCCACUUAC-5' (配列番号: 25)、および 3'-UCCCACUUUC-5' (配列番号: 26) が好ましい。これらの配列は、プラス鎖をコードするDNA配列で表すとそれぞれ 5'-AGGGTCAAAG-3' (配列番号: 27)、5'-AGGGTGAATG-3' (配列番号: 28)、および 5'-AGGGTGAAAG-3' (配列番号: 29) である。センダイウイルスベクターのE配列としては、例えば 3'-AUUCUUUUU-5' (配列番号: 30) (プラス鎖をコードするDNAでは 5'-TAAGAAAAA-3' (配列番号: 31)) が好ましい。I配列は、例えば任意の3塩基であってよく、具体的には 3'-GAA-5' (プラス鎖DNAでは 5'-CTT-3') を用いればよい。

#### 【0079】

マイナス鎖RNAウイルスを製造する具体的な方法の1つとしては、例えば一過的にウイルス製造を行う方法が挙げられる。この方法の1つは、哺乳動物プロモーターの制御下にリボザイムとマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAまたはその相補鎖とをコードするDNAを転写するベクターを、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを含むRNPを構成するウイルス蛋白質を発現するベクターと共に哺乳動物細胞にトランスフェクションする方法である。RNPを構成するウイルス蛋白質の存在下で、哺乳動物プロモーターからマイナス鎖RNAウイルスゲノムRNAまたはアンチゲノムRNAが転写されることにより、機能的RNPが形成されてウイルスが再構築される。細胞において生産されたマイナス鎖RNAウイルスまたはその増殖産物を回収することにより、マイナス鎖RNAウイルスベクターを得ることができる。

#### 【0080】

また、別の方法においては、哺乳動物プロモーターの制御下にバクテリオファージのRNAポリメラーゼをコードするDNAを含むベクターと、該RNAポリメラーゼの認識配列の下流に連結されたマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNAを含むベクターを、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを含むRNPを構成するウイルス蛋白質(N、L、およびP)を発現するベクターと共に哺乳動物細胞にトランスフェクションする。RNPを構成するウイルス蛋白質の存在下で、哺乳動物プロモーターからRNAポリメラーゼが発現し、これによりマイナス鎖RNAウイルスゲノムRNAまたはアンチゲノムRNAが転写されることにより、機能的RNPが形成されてウイルスが再構築される。細胞において生産されたマイナス鎖RNAウイルスまたはその増殖産物を回収することにより、マイナス鎖RNAウイルスベクターを得ることができる。

#### 【0081】

トランスフェクションに用いるベクターとしては、例えばプラスミドが好適である。各プラスミドは、それぞれ種類の蛋白質が発現するようにしてもよいし、複数の蛋白質を1つのプラスミドから発現させてもよい。このためには、1つのプラスミドにプロモーターを複数持たせるか、あるいはIRES等の利用して1つのプロモーターから複数の蛋白質を生成させることもできる。トランスフェクションによるウイルス生産は、特別な細胞を用いなくても迅速にウイルスを製造できる点で優れている。プロモーターとしては、哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができるが、好ましくはCAプロモーターを使用する。

#### 【0082】

バクテリオファージのRNAポリメラーゼを発現させるために、ウイルスベクターを用いることもできる。例えば、紫外線(UV)照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を用いてマイナス鎖RNAウイルスを製造する方法が知られている (W000/70055, W000/70070、および W003/025570; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000); Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。得られたマイナス鎖RNAウイルス溶液に含まれ得るワクシニアウイルスは、ウイルス溶液(培養上清)を適



宜希釈して再増幅を3回程度繰り返すことにより完全に除去することができる。

#### 【0083】

本発明のウイルス製造方法の他の様態では、ウイルスの生成に必要な蛋白質および/またはRNAを、ウイルス生産細胞の染色体から発現させる。この方法は、哺乳動物プロモーターからウイルスゲノムRNAまたはその相補鎖を転写するDNA、あるいは、哺乳動物プロモーターからバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼを発現するDNAが、哺乳動物細胞の染色体に組み込まれた細胞株を用いる方法である。形質転換細胞のクローニングにより、発現量の高い細胞を選択することで、より高い力価のウイルスを生産する能力を持つ細胞を調製することができる。このため、高力価のウイルスを安定して製造するために有用である。これらの細胞株においては、普段は哺乳動物プロモーターからウイルスゲノムRNAやRNAポリメラーゼを発現しないが、刺激に応答して発現を誘導できるようにすることも好適である。上記のloxPやFRTを用いて、誘導的に哺乳動物プロモーターから遺伝子を発現させることができる。ウイルス製造時にCreリコンビナーゼやFLPリコンビナーゼを発現させ、哺乳動物プロモーターからの発現を誘導する。プロモーターとしては、哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができるが、好ましくはCAプロモーターを使用する。この細胞の染色体上に、さらに改変F蛋白質遺伝子を導入するとよい。

#### 【0084】

この細胞で、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAを含むRNPを構成するウイルス蛋白質(N、L、およびP)の存在下、ウイルスゲノムRNAまたはその相補鎖を転写させ、改変F蛋白質の発現を誘導することにより、マイナス鎖RNAウイルスの再構築を行うことができる。RNP構成蛋白質は、それらをコードするプラスミドベクターのトランスフェクションにより供給すればよい。

#### 【0085】

トランスフェクションに用いる各プラスミドの量を例示すれば、マイナス鎖RNAウイルスのゲノムをリボザイムで切り出す方法(HamRbz法)においては、NP発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g(より好ましくは0.3 $\mu$ g)、P発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g(より好ましくは0.5 $\mu$ g)、L発現プラスミドを0.5 $\mu$ g~4.5 $\mu$ g(より好ましくは2.0 $\mu$ g)、F発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~5 $\mu$ g(より好ましくは0.5 $\mu$ g)、ウイルスゲノムRNA(プラス鎖またはマイナス鎖)をコードするプラスミドを0.5 $\mu$ g~5 $\mu$ g(より好ましくは5 $\mu$ g)用いるとよい。例えばSeVの製造のためには、実施例に記載の各プラスミドを以下の量でトランスフェクションに使用するとよい。

pCAGGS-NP	0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g (より好ましくは0.3 $\mu$ g)
pCAGGS-P	0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g (より好ましくは0.5 $\mu$ g)
pCAGGS-L(TDK)	0.5 $\mu$ g~4.5 $\mu$ g (より好ましくは2.0 $\mu$ g)
pCAGGS-F5R	0.1 $\mu$ g~5 $\mu$ g (より好ましくは0.5 $\mu$ g)
pCAGGS-SeV	0.5 $\mu$ g~5 $\mu$ g (より好ましくは5 $\mu$ g)
(pCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFP)	

マイナス鎖RNAウイルスのゲノムをバクテリオファージのRNAポリメラーゼを介して転写させる方法においては、NP発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g(より好ましくは0.5 $\mu$ g)、P発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g(より好ましくは0.5 $\mu$ g)、L発現プラスミドを0.5 $\mu$ g~4.5 $\mu$ g(より好ましくは2.0 $\mu$ g)、F発現プラスミドを0.1 $\mu$ g~5 $\mu$ g(より好ましくは0.5 $\mu$ g)、ウイルスゲノムRNA(プラス鎖またはマイナス鎖)をコードするプラスミドを0.5 $\mu$ g~5 $\mu$ g(より好ましくは5 $\mu$ g)用いるとよい。例えばSeVの製造のためには、実施例に記載の各プラスミドを以下の量でトランスフェクションに使用するとよい。

pCAGGS-NP	0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g (より好ましくは0.5 $\mu$ g)
pCAGGS-P	0.1 $\mu$ g~2 $\mu$ g (より好ましくは0.5 $\mu$ g)
pCAGGS-L(TDK)	0.5 $\mu$ g~4.5 $\mu$ g (より好ましくは2.0 $\mu$ g)
pCAGGS-F5R	0.1 $\mu$ g~5 $\mu$ g (より好ましくは0.5 $\mu$ g)
pCAGGS-SeV	0.5 $\mu$ g~5 $\mu$ g (より好ましくは5 $\mu$ g)
(pCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFP)	

## 【0086】

ウイルスゲノムをコードするDNAにおいて、F遺伝子以外のエンベロープ構成蛋白質の遺伝子（例えば HN遺伝子および/またはM遺伝子等）も欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることができる（W000/70055 および W000/70070; Hirata, T. et al., 2002, J. Virol. Methods, 104:125-133; Inoue, M. et al., 2003, J. Virol. 77:6419-6429）。ウイルス生産細胞においてエンベロープ構成蛋白質を発現させる場合は、哺乳動物細胞で発現させるための所望のプロモーターを用いることができるが、好ましくはCAプロモーターを使用する。

## 【0087】

トランスフェクションから48～72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回程度繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物を細胞に再度トランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、細胞の培養液に添加して感染させ培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンまたはポリカチオンリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169)、TransIT-LT1 (Mirus, Product No. MIR 2300) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が進行しウイルスが増幅する。回収されたベクターは-80℃で保存することができる。エンベロープ構成蛋白質をコードする遺伝子を欠損した伝播能を持たないウイルスを再構成させるには、エンベロープ構成蛋白質を発現する細胞（ヘルパー細胞）をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ構成蛋白質発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行ったウイルス生産細胞に、エンベロープ構成蛋白質を発現する細胞を重層してさらに培養することによってエンベロープ構成蛋白質遺伝子欠損型ウイルスを増幅することもできる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。

## 【0088】

マイナス鎖RNAウイルスの製造についてのより詳細は、公知の方法を参照することができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; W097/16539; W097/16538; W000/70055; W000/70070; W003/025570; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法に本発明に方法を適用することにより、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから高い効率で再構成させることができる。

## 【0089】

回収されたウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる (W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Pre

ss: pp. 295-306, 1999)。また、GFP (緑色蛍光蛋白質) などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる (例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる (W000/70070)。

#### 【0090】

ウイルスが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来のLLC-MK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。特に本発明の方法は、従来では困難であったヒト細胞を用いてウイルス製造を行うことを可能にする。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている (中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコルIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間 37~38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間 (例えば3日間) 卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる (田代真人, 「ウイルス実験プロトコル」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73, (1995))。

#### 【0091】

本明細書に記載したウイルス製造方法に従えば、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、例えば  $1 \times 10^5$  CIU/mL以上、好ましくは  $1 \times 10^6$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^6$  CIU/mL以上、より好ましくは  $1 \times 10^7$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^7$  CIU/mL以上、より好ましくは  $1 \times 10^8$  CIU/mL以上、より好ましくは  $5 \times 10^8$  CIU/mL以上の力価でウイルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウイルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990); W000/70070)。

#### 【0092】

本発明の方法により製造したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション (濾過)、遠心分離、吸着、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその任意の組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターを含む溶液中で該ウイルスの成分が主要な割合を占めることを言う。例えば実質的に純粋なウイルスベクター組成物は、溶液中に含まれる全蛋白質 (但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く) のうち、ウイルスベクターの成分として含まれる蛋白質の割合が10% (重量/重量) 以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。例えばパラミクソウイルスベクターであれば、具体的な精製方法としては、セルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法 (特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法 (W097/32010) 等を例示することができるが、これらに制限されない。

#### 【0093】

本発明のウイルスベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。このような担体または媒体としては、例えば滅菌水、塩化ナトリウム溶液、デキストロース溶液、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸含有リンゲル溶液、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などが挙げられ、これらとベクターを適宜組み合わせることで製剤化することが考えられる。また本発明の組成物は、脱イオン水、デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。

また、リボソームの膜安定化剤（例えばコレステロール等のステロール類）を含んでいてもよい。また、抗酸化剤（例えばトコフェロールまたはビタミンEなど）を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。また本発明の組成物は溶液、凍結乾燥物、またはエアロゾルの形態の組成物であってよい。凍結乾燥物の場合は安定化剤としてソルビトール、シュクロース、アミノ酸及び各種蛋白質等を含んでいてもよい。製造されたウイルスベクター組成物は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む所望の哺乳動物および動物細胞への遺伝子導入のための試薬および医薬として有用である。本発明の方法により製造されたウイルスベクターは、特にヒトへの遺伝子治療に好適に用いられる。

#### 【実施例】

##### 【0094】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

##### 【0095】

[実施例1] F遺伝子発現プラスミドへのfurin認識配列の導入

LLC-MK2以外の細胞を利用して、F遺伝子欠失型SeVベクター（SeV/ $\Delta$ F）が回収可能なパッケージング細胞（特にヒト由来細胞を利用したパッケージング細胞）を作出するために、パッケージング細胞において発現するF蛋白質にfurin認識配列を導入した。導入する配列は、furinが認識するコンセンサス配列であるR-(X)-R/K-Rの配列（Chambers, T. J. et al., Annu. Rev. Microbiol. 44, 649-688 (1990)）を基に、元のF蛋白の配列から最も変異が少ないR-Q-K-Rの配列（F(furin)）と、切断効率が良くなることが期待される(R)-R-R-Rの配列（F(5R)）の2種の配列を用いた（図1）。また、F遺伝子の発現はCre/loxP発現誘導システムを利用した。当該システムの構築のため、LLC-MK2を利用したF蛋白のパッケージング細胞（LLC-MK2/F7細胞）（Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000), W000/70070）を樹立した時と同様、Cre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw（Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)）を利用した。

##### 【0096】

まず、Zeocin耐性遺伝子を有するpCALNdLwにF遺伝子を導入したプラスミド（pCALNdLw-ZeoF：特願2001-283451）を用いて、F遺伝子へのfurin認識配列（R-Q-K-R：F(furin)）の導入を行った。サブクローニングの手順の概略を図2に示した。pCALNdLw-ZeoFをテンプレートにしてploxF（5' -CATTTTGGCAAAGAATTGATTAATTCGAG-3' /配列番号：32）及びpFfurinR（5' -TCACAGCACCCAAGAATCTCTTCTGGCGAGCACCGGCATTTTGTGTC-3' /配列番号：33）のプライマーの組み合わせでPfu Turbo（STRATAGENE, La Jolla, CA）を使用してPCRを行った（手順1）。また同じくpCALNdLw-ZeoFをテンプレートにしてpFfurinF（5' - GACACAA AATGCCGGTGCTCGCCAGAAGAGATTCTTGGGTGCTGTGA-3' /配列番号：34）及びpFXho2R（5' - GA TCGTAATCACAGTCTCTCGAGAGTTGTACCATCTACCTAC -3' /配列番号：35）のプライマーの組み合わせでPCRを行った（手順2）。この時に使用しているpFfurinR及びpFfurinFの両primerにfurin認識配列（この場合はR-Q-K-R）への変異のための配列を導入している。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で分離後、手順1の1470 bpのバンドと手順2の1190 bpのバンドをそれぞれ切り出し、GENE CLEAN KIT（フナコシ、東京）を使用して回収した（それぞれ、フラグメント(i)、フラグメント(ii)とする）。精製したフラグメント(i)とフラグメント(ii)をそれぞれ10倍希釈したものを1 $\mu$ lずつを混合し、さらにploxF及びpXho2Rのプライマーの組み合わせでPfu Tarboを使用しPCRを行った（手順3）。PCR産物5 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した結果、予想される2.6 kbpのバンドが検出された。そこで、残りのPCR産物をQiaquick PCR Extraction kit（QIAGEN, Bothell, WA）で精製した。その後Dra IIIとMfe Iで連続的に制限酵素処理を行い、アガロー

スゲル電気泳動で分離後、約2.0 kbpのバンドを切り出した（フラグメント3）。別途、pCALNdLw-Zeo-Fを Dra IIIとMfe Iで連続的に消化し、アガロースゲル電気泳動により分離し、約6kbpのバンドを切り出し、GENE CLEAN KITで精製した（フラグメント4）。これらフラグメント3とフラグメント4をライゲーションすることによりpCALNdLw-Zeo-F(furin) (pCALNdLw-Zeo-F furinとも記載) を構築した。

#### 【0097】

次に、pCALNdLw-ZeoF上のF遺伝子へ、より切断が効率的なfurin認識配列 ((R)-R-R-R-R : F(5R)) の導入を行った。サブクローニングの手順の概略を図3に示した。上記で調製したpCALNdLw-Zeo-F(furin)をテンプレートにして、ploxF及び pF5R-R (5' - TCACAGCACC GAAGAATCTCTCCGCGACGACCGGCATTTTGTGTCGTATC-3' / 配列番号: 36) のプライマーの組み合わせでを使用してPCRを行った（手順5）。また同じくpCALNdLw-Zeo-F(furin)をテンプレートにしてpF5R-F (5' - GATACGACACAAAATGCCGGTCGTCGCCGAGGAGATTCTTCGGTGCTGTGA-3' / 配列番号: 37) 及びR5437 (5' -AAATCCTGGAGTGTCTTTAGAGC-3' / 配列番号: 38) のプライマーの組み合わせでPCRを行った（手順6）。この時に使用しているpF5R-R及びpF5R-Fの両primerにfurin認識配列（この場合は(R)-R-R-R-R) への変異のための配列を導入している。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で分離後、手順5の1470 bpのバンドと手順6の200 bpのバンドをそれぞれ切り出し、Qiaquick gel Extraction kit でそれぞれ精製した（それぞれ、フラグメント5、フラグメント6とする）。精製したフラグメント5とフラグメント6をそれぞれ50倍希釈したものを1μlずつを混合し、さらにploxF及びR5437のプライマーの組み合わせでPfu Tarboを使用しPCRを行った（手順7）。5μlのPCR産物をアガロースゲル電気泳動で分離後、染色し、約1.6 kbpのバンドを確認した。そこで、残りをQiaquick PCR Purification kitで精製しCla IとFseIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、約1 kbpのバンドを切り出し、Qiaquick PCR Purification kitで精製した（フラグメント7）。別途、pCALNdLw-Zeo-F(furin)をCla IとFse Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、約8 kbpのバンドを切り出しQiaquick PCR Purification kitで精製した（フラグメント8）。これらフラグメント7とフラグメント8をライゲーションすることによりpCALNdLw-Zeo-F(5R) (pCALNdLw-Zeo F5Rとも記載する) を構築した。このpCALNdLw-Zeo F5RをXho Iで消化し、精製後ライゲーションを行いXho I断片（Zeocin抵抗性遺伝子を含む）を含まないものを選択し、pCAGGS-F5Rを得た。

#### 【0098】

[実施例2] その他のプラスミドの構築

・pCAGGS(Btype)の構築 (図4)

pCALNdLw(Arai, T. et al. J. Virology 72, 1998, p1115-1121)をXho Iで消化し、Qiaquick PCR Purification kitで精製し、ライゲーションを行った。Xho I断片が除かれたものを選別し、得たものをpCAGGS(B type)とした。pCAGGS(B type)をSal Iで消化し、Pfu DNA polymeraseでブランチ化し、Qiaquick PCR Purification kitで精製し、ライゲーションを行った。Sal Iサイトがつぶれたものを選別し、pCAGGS(BSX)とした。

#### 【0099】

・pCAGGS-NPの構築 (図5)

pCALNdLwをSpe I及びEcoT22Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。2651 bp断片と3674 bp断片を切り出し、Qiaquick gel Extraction kit で精製した。2651 bp断片をさらにXho Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、1761 bpのバンドを精製した。Zeocin抵抗性遺伝子をpcDNA3.1/Zeo(+)をテンプレートにしてプライマー 5'-TCTCGAGTCGCTCGGTACGATGGCCAAGTTGACCAAGTCCCGTTCGGTGCTCAC-3' (配列番号: 39) 及びプライマー 5'-AATGCATGATCAGTAAATTACAATGAACATCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTG-3' (配列番号: 40) を用いてPCRにより増幅しXhoI及びEcoT22Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、438 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kit で精製した。このZeocin抵抗性遺伝子を含むバンドと上記3674 bp及び1761bpの3種類の断片をライゲーションにより連結してpCALNdLw-Zeoを得た。このpCALNdLw-ZeoをSwaIで消化しEco RIリンカー (STRATAGENE) を挿入することでpCALNdLWE-Zeoを得た。マルチクロー

ニングサイトが導入されたセンダイウイルスcDNA (特開2002-272465) (以下pSeV(TDK)と称す)をNot I及びXho Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、1669 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kitで精製した。このNP遺伝子を含む断片をNot I及びXho I消化したpGEM11zf(+) (Promega)へ挿入し、pGEM-NP(Z)PCR14-3とした。これをテンプレートにしてプライマー 5'-CCGGAATTCAACAAATGGCCGGGTTGTTGAGCACCTTCGA-3' (配列番号: 41) 及び5'-CCGGAATTCCTAGATTCTCTATCCCAGCTACTGCTGCTCG-3' (配列番号: 42)を用いてPCRにより増幅し、Eco RI消化後、pCALNdLWE-ZeoのEco RIサイトに導入し、pCALNdLWE-Zeo-NP(Z)を得た。次にpCALNdLWE-Zeo-NP(Z)をXho I消化し、ライゲーションを行い、Xho I断片を除いたプラスミドを構築し、これをpCAGGS-NPとした。

#### 【0100】

- ・pCAGGS-P4C(-)の構築 (図6)

pCALNdLw-HygroM (Makoto Inoue et al. J. Virology 77, 2003, p6419-6429) をXhoIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、Hygromycin抵抗性遺伝子を含む1679 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kitで精製した。pCALNdLwをXho I消化し、アガロースゲル電気泳動後4864 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kitで精製した。両方の断片を用いてライゲーションを行いpCALNdLw-Hygroを構築した。このpCALNdLw-HygroをSwaIで消化し、Nhe Iリンカー (STRATAGENE) を挿入することでpCALNdLWN-Hygroを得た。4C(-)SeV cDNA (Kurotani, Kato, Nagai, et al Genes to Cells 3, 1998, p111-124) をテンプレートにして 5'-CTAGCTAGCCCACCATGGATCAAGATGCCTTCATTCTAAAAGAAGATTCT-3' (配列番号: 43) 及び 5'-CTAGCTAGCCTAGTTGGTCAGTGACTCTATGTCCTCTTCTACGAGTTCAC-3' (配列番号: 44) を用いてKOD-PLUS DNA Polymerase (ToYoBo) でPCRを行った。gene clean kitを用いて精製し、PCR産物をNhe Iで消化し、gene clean kit で精製した。これを、上記のpCALNdLWN-hygroのNhe Iサイトに導入し、pCALNdLWN-hygro-P(Z)k4C(-)を得た。これをXho Iで消化し、Qiaquick PCR Purification kitで精製後、ライゲーションを行いXho I断片 (Hygromycin抵抗性遺伝子領域) を除いたものを選択し、pCAGGS-P4C(-)を得た。

#### 【0101】

- ・pCAGGS-L(TDK)の構築 (図7)

pSeV(TDK) をFse I及び Sac IIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、6732 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kitで精製した。Pfu DNA PolymeraseとdNTPを使用し、72℃で10分間反応させブランチ化した。Qiaquick PCR purification kitで精製後、pCAGGS(BSX)のSwa Iサイトに導入しpCAGGS-L(TDK)を得た。

#### 【0102】

- ・pCAGGS-Fの構築 (図8)

pCALNdLw/F (Hai-Ou Li et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569) をXho I消化、精製後、ライゲーションを行いXho I断片 (Neomycin耐性遺伝子領域) が除かれたものを選択し、pCAGGS-Fを得た。

#### 【0103】

- ・pCAGGS-T7の構築 (図9)

pTF7-3 (ATCC No.67202) をBam HIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、T7 RNA Polymerase遺伝子を含む2.65 kbpの断片を回収し、pMW219 (ニッポンジーン) のBam HIサイトに挿入しpMW219-T7を得た。このpMW219-T7をSal Iで消化後、DNA Bluntting kit (TaKaRa) を使用して平滑末端にし、Eco RIリンカー (Stratagene #901026) を導入し、pMW219-T7-Eco RIを得た。このpMW219-T7-Eco RIをEco RIで消化し、T7 RNA Polymeraseを含むEco RI断片を精製し、上記pCALNdLWEのEco RIサイトに導入することでpCALNdLWE-T7を得た。

#### 【0104】

- ・pCAGGS-SeVおよびpCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFPの構築 (図10～12)

pSeV(TDK)をNot I及びKpn Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、2995 bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kitで精製した。MlinkerF 5'-GGCCGCGTCGACA



TCGATGCTAGCCTCGAGCCGCGGTAC-3' (配列番号: 45) と MlinkerR 5'-CGCGGCTCGAGGCTAGCATCG ATGTCGACGC-3' (配列番号: 46) を各 2  $\mu$ g (2  $\mu$ l) と H<sub>2</sub>O を 21  $\mu$ l を混合し、95℃5分、85℃15分、65℃15分、37℃15分、25℃15分、4℃でアニーリングさせた。この混合液と pSeV (TDK) NotI-Kpn I 精製液をライゲーションし、pSeV/Linker を得た。この pSeV/Linker を テンプレートにして、pGEM-F5 5'-CTTAACATATGCGGCATCAGAGC-3' (配列番号: 47) 及び pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3' (配列番号: 48) を使用し、KOD-Plus (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い Qiaquick PCR Purification kit を使用して精製した。その精製液を テンプレートとして RibLF1 5'-CTATAGGAAAGGAATTCCTATAGTCACCAAACAAGAG-3' (配列番号: 49) と pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3' (配列番号: 48) を使用し、KOD-PLUS (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い Qiaquick PCR Purification kit を使用して精製した。この精製液を テンプレートにして、RibLF2 5'-GATGAGTCCGTGAGGACGAACTATAGGAAAGGAATTC-3' (配列番号: 50) と pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3' (配列番号: 48) を使用し、KOD-Plus (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い Qiaquick PCR Purification kit を使用して精製した。さらにこの精製液を テンプレートにして RibLF3 5'-GCGGGCCCTCTCTTGTGTTGCTGATGATGCCGTGAGGAC-3' (配列番号: 51) と pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3' (配列番号: 48) を使用し、KOD-Plus (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い Qiaquick PCR Purification kit を使用して精製した。この精製 PCR 産物を pCAGGS (BSX) の Sma I サイトに導入し、pCAGGS-SeV(m) とした。次に pSeV18+b(+)/ $\Delta$ F-EGFP (Hai-Ou Li et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569) を Not I 及び Sal I で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、1972 bp のバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kit で精製し、Not I 及び Sal I 消化し、精製した pCAGGS-SeV(m) とライゲーションし、pCAGGS-SeV(m)A を得た。pSeV(+)/18/ $\Delta$ F を Nhe I 及び Kpn I で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、3325 bp のバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kit で精製し、Not I 及び Sal I 消化し、精製した pCAGGS-SeV(m) とライゲーションし、pCAGGS-SeV(m)AC を得た。

#### 【0105】

pSeV18+b(+)(Hai-Ou Li et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569) を Sal I 及び Nhe I で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。そして、LITMUS38 (NEW ENGLAND BioLabs) の Sal I-Nhe I サイトに導入し Litmus38/SeV Sal I-Nhe I を得た。この Litmus38/SeV Sal I-Nhe I を Sal I 及び Nhe I で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、9886 bp のバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kit で精製し、pCAGGS-SeV(m)AC の Sal I-Nhe I サイトに導入することで pCAGGS-SeV を得た。

#### 【0106】

pSeV/ $\Delta$ F-EGFP (Hai-Ou Li et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569) を Sal I 及び Nhe I で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。そして、LITMUS38 (NEW ENGLAND BioLabs) の Sal I-Nhe I サイトに導入し Litmus38/Sal I-Nhe I  $\Delta$ F-GFP を得た。この Litmus38/Sal I-Nhe I  $\Delta$ F-GFP を Sal I 及び Nhe I で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、8392 bp のバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction kit で精製し、pCAGGS-SeV(m)AC の Sal I-Nhe I サイトに導入することで pCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFP を得た。

#### 【0107】

・ pGEM-IRES-Luci の構築

pMAMneo-Luci (Clontech) から Bam HI で消化して得た ルシフェラーゼ フラグメント を pTM1 (Nature, 348, 1, November, 1990, 91-92) の Bam HI サイトへ導入し pIRES-Luci を構築した。

#### 【0108】

【実施例 3】 T7 RNA Polymerase 発現 BHK-21 (以下 BHK/T7 とする) の樹立

上記で構築した pCALNDLWE-T7 を BHK-21 細胞に mammalian transfection kit (Stratagene) または、SuperFect (Qiagen) を使用して トランスフェクションを行った。400  $\mu$ g/ml の G418 を含む D-MEM で 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 2 週間培養し、単一の細胞から増殖した薬剤耐性クローンを得た。得られた薬剤耐性クローンは Cre DNA recombinase を発現する組み換えアデノウイルス (AxCANCre) を Moi=4 で感染し、24 時間後に細胞を PBS で 1 回洗浄した後に、細胞を

回収し、anti-T7 RNA Polymerase rabbit Polyclonal anti-bodyを使用したウエスタンブロット解析によってT7 RNA Polymeraseの発現を確認した。

発現の確認出来たクローンに関してpGEM-IRES-LuciをSuperFectを使用してトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収しデュアルルシフェラーゼレポーターシステム (Promega) キットを使用しMiniLumat LB9506 (EG&G BERTHOLD) にてルシフェラーゼ活性を測定しT7 RNAPolymeraseの活性を確認した。

#### 【0109】

##### [実施例4] F欠失型SeVベクターの回収

ハンマーヘッドリボザイムを付加したセンダイウイルスゲノムを転写するベクターを用いたウイルスベクター製造方法 (以下HamRbz法とする) によりF遺伝子欠失型SeVの回収を行った。ヒト胎児腎由来293T細胞を、トランスフェクションする前日に  $1 \times 10^6$  cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM で6 well plateに蒔いた。トランスフェクションは以下の様にして行った。Opti-MEM  $30 \mu\text{l}$  にTransIT-LT1 (Mirus) を  $15 \mu\text{l}$  を混合し、室温で10~15分間培養した。この間にDNA溶液を調整した。Opti-MEMに  $20 \mu\text{l}$  にpCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFPをそれぞれ  $0.3 \mu\text{g}$ ,  $0.5 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$ ,  $0.5 \mu\text{g}$ ,  $0.5 \sim 5 \mu\text{g}$  を溶解した。10~15分後にTransIT-LT1溶液とDNA溶液を混合し室温で15分間静置した。この間に細胞の培地抜いて新しい10% FBS入りのD-MEMを1ml/wellで静かに添加した。15分後、Opti-MEM (GIBCO)  $500 \mu\text{l}$  をDNA-TransIT-LT1 混合物に加え、全量を細胞に添加して培養した。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で72時間培養後、培養液を捨て、トリプシン  $7.5 \mu\text{g/ml}$  を含む (血清を含まない) MEM (以下Try-MEM) に  $1 \times 10^6$  cells/ml になるように懸濁したLLC-MK2/F7/A 細胞 (F発現を誘導した細胞は LLC-MK2/F7/Aと記載する; Li, H.-O. et al., J. Virology 74. 6564-6569 (2000), W000/70070) を1 ml/well で重層し、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。それから24時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1 ml加え、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。48時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1 ml加え、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。72時間後に培養液1 mlを回収した。回収した培養液は、7.5% BSAを  $133 \mu\text{l}$  加え (最終濃度1% BSA)、CIUを測定するまで-80℃で保存した。

#### 【0110】

以下のように、GFP発現細胞のカウントによるCIUの測定 (GFP-CIU) を実施した。CIUアッセイの2~3日前にLLC-MK2 細胞を12 well-plateに蒔いた。2日前の場合は  $1.5 \times 10^5$  cells/wellの割合で、10% FBS入りのMEM 1ml/wellで蒔き、3日前の場合は、  $8.0 \times 10^4$  cells/wellの割合で、10% FBS入りのMEM 1ml/wellで蒔いた。CIUアッセイの当日に血清を含まないMEM で1回洗浄した後、重層後24、48、72時間目に回収した培養液を1/10希釈系列をMEM 培地で作製し、37℃ 1時間感染後、MEM 培地で1回洗浄後、MEM 培地1 mlを添加した。37℃で2日培養後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し、適度な希釈のウェルのGFP陽性細胞の数を数えた。その結果、重層72時間後に、  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  GFP-CIU/mlのウイルスベクターが回収された (図13)。

#### 【0111】

[実施例5] F遺伝子の供給を野生型 (以下F) とfurin認識配列を導入したF (以下F5R) の場合の生産性の比較

pCAGGSでFタンパク質を供給する時に、野生型のF遺伝子を用いた場合とfurin認識配列を導入したF5Rで再構成効率の比較を行った。293T 細胞をトランスフェクションする前日に  $1 \times 10^6$  cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM で6 well plateに蒔いた。トランスフェクションは以下の様にして行った。Opti-MEM  $30 \mu\text{l}$  にTransIT-LT1 (Mirus) を  $15 \mu\text{l}$  を混合し、室温で10~15分間培養した。この間にDNA溶液を調整した。Opti-MEMに  $20 \mu\text{l}$  にpCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L, pCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFPをそれぞれ  $0.3 \mu\text{g}$ ,  $0.5 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$  に固定し、pCAGGS-FとpCAGGS-F5Rを  $0.1 \mu\text{g}$ ,  $0.3 \mu\text{g}$ ,  $0.5 \mu\text{g}$ ,  $0.7 \mu\text{g}$ ,  $0.9 \mu\text{g}$  と条件を振って溶解した。10~15分後にTransIT-LT1溶液とDNA溶液を混合し室温で15分間静置した。この間に細胞の培地抜いて新しい10% FBS入りのD-MEMを1 ml/wellで静かに添加した。15分後、Opti-MEM (GIBCO)  $500 \mu\text{l}$  をDNA-TransIT-LT1 混合物に加え、全量を細胞に



添加して培養した。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で72時間培養後、培養液を捨て、トリプシン 7.5 μg/ml を含む（血清を含まない）MEM（以下Try-MEM）に1×10<sup>6</sup> cells/mlになるように懸濁したLLC-MK2/F7/A細胞を1 ml/well で重層し、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。それから24時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1ml加え、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。48時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1ml加え、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。72時間後に培養液1 mlを回収した。回収した培養液は、7.5% BSAを133 μl 加え（最終濃度1% BSA）、CIUを測定するまで-80℃で保存した。全てのサンプルを回収後にCIU アッセイを行った。その結果、pCAGGS-Fは0.7 μgの時に最も再構成効率が良く、重層24時間目、48時間目、72時間目でそれぞれ0 CIU/ml, 7.9×10<sup>2</sup> CIU/ml, 3.3×10<sup>4</sup> CIU/mlのウイルスベクターを含んでいた。一方で、pCAGGS-F5Rを使用した場合は、0.5 μgの時に最も良く重層24時間目、48時間目、72時間目でそれぞれ3.2×10<sup>4</sup> CIU/ml, 5.7×10<sup>5</sup> CIU/ml, 1.2×10<sup>7</sup> CIU/mlのウイルスベクターを含んでいた。両者で再構成効率が最も良かった条件で比較してみると、pCAGGS-F5Rを使用する場合の方がpCAGGS-Fを使用する場合よりも再構成効率はるかによく、重層72時間目で373倍高いウイルスベクターを得ることが出来た（図14）。

#### 【0112】

##### 【実施例6】 伝播型SeVベクターの製造

pCAGGS-T7を使用してT7 RNAポリメラーゼによりSeVゲノムを転写させるウイルスベクター製造方法（以下pCAGGS-T7法とする）により伝播型SeVの回収を行った。トランスフェクションする前日に各細胞を6 well plateに蒔いた（293T 細胞：1×10<sup>6</sup> cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM、LLC-MK2細胞：5.0×10<sup>5</sup> cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM、BHK-21細胞：2.5×10<sup>5</sup> cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM、BHK/T7細胞：2.5×10<sup>5</sup> cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM）。トランスフェクションは以下の様に行った。Opti-MEM 30 μlにTransIT-LT1 (Mirus) 15 μlを混合し、室温で10～15分間培養した。この間にDNA溶液を調整した。Opti-MEMに20 μlにpCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pSeV(TDK)18+GFPをそれぞれ 0.5 μg, 0.5 μg, 0.5 μg, 2 μg, 5 μgを溶解した。10～15分後にTransIT-LT1溶液とDNA溶液を混合し室温で15分間静置した。この間に細胞の培地抜いて新しい10% FBS入りのD-MEMを1 ml/wellで静かに添加した。15分後、Opti-MEM (GIBCO) 500 μlをDNA-TransIT-LT1 混合物に加え、全量を細胞に添加して培養した。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で3日間培養した。このとき、GFP陽性細胞の数をカウントした結果、293T細胞で246個、LLC-MK2細胞で16個、BHK-21細胞で288個、BHK/T7細胞で405個であった。その後、培養液を捨て、PBS(-) 1 mlを細胞に添加し、セルスクレーパーで剥がし、エッペンドルフチューブに回収した。1回凍結融解をした後に、希釈しない細胞懸濁液とPBS(-)で10倍、100倍、1000倍希釈した細胞懸濁液100 μlを10日鶏卵にそれぞれ接種した。孵卵機にて35℃で3日間培養した。その後、尿液を回収し、HA アッセイを行った。その結果、希釈しない293T細胞、BHK-21細胞、BHK/T7細胞懸濁液を接種した鶏卵でウイルスの増殖を確認出来た（図15）。

#### 【0113】

##### 【実施例7】 F欠失型SeVベクターの製造 II

293T 細胞をトランスフェクションする前日に 1×10<sup>6</sup> cells/well/2 ml 10% FBS入りのD-MEM で6 well plateに蒔いた。トランスフェクションは以下の様に行った。Opti-MEM 30 μlにTransIT-LT1 (Mirus) を15 μlを混合し、室温で10～15分間培養した。この間にDNA溶液を調整した。Opti-MEMに20 μlにpCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pSeV/ΔF-GFP (W000/70070) をそれぞれ 0.5 μg, 0.5 μg, 0.5 μg, 2 μg, 0.5 μg, 0.5～5 μgを溶解した。10～15分後にTransIT-LT1溶液とDNA溶液を混合し室温で15分間静置した。この間に細胞の培地抜いて新しい10% FBS入りのD-MEMを1ml/wellで静かに添加した。15分後、Opti-MEM (GIBCO) 500 μlをDNA-TransIT-LT1 混合物に加え、全量を細胞に添加して培養した。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で72時間培養後、培養液を捨て、Try-MEMに1×10<sup>6</sup> cells/mlになるように懸濁したLLC-MK2/F7/A細胞を1ml/well で重層し、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。それから24時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEM

を1ml加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。48時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1ml加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。72時間後に培養液1 mlを回収した。回収した培養液は、7.5% BSAを133 $\mu$ l 加え（最終濃度1% BSA）、CIUを測定するまで-80℃で保存した。

#### 【0114】

以下のように、GFP発現細胞のカウントによるCIUの測定(GFP-CIU)を実施した。CIUアッセイの2~3日前にLLC-MK2 細胞を12 well-plateに蒔いた。2日前の場合は $1.5 \times 10^5$  cells/wellの割合で、10% FBS入りのMEM 1ml/wellで蒔き、3日前の場合は、 $8.0 \times 10^4$  cells/wellの割合で、10% FBS入りのMEM 1ml/wellで蒔いた。CIUアッセイの当日に血清を含まないMEM で1回洗浄した後、重層後24、48、72時間目に回収した培養液を1/10希釈系列をMEM 培地で作製し、37℃ 1時間感染後、MEM培地で一回洗浄後、MEM 培地 1 ml を添加した。37℃で2日培養後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し、適度な希釈のウェルのGFP陽性細胞の数を数えた。その結果、重層72時間後に、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  GFP-CIU/mlのウイルスベクターが回収された(図16)。

このpCAGGS-T7法はプラスミドの導入細胞に293T細胞を使用した時は、リン酸カルシウム法によってもSeV18+GFP/ $\Delta$ Fの回収に成功した。効率、TransIT-LT1と同等以上であった(図17)。

#### 【0115】

[実施例8] pCAGGS-T7法の細胞種の検討

pCAGGS-T7法が293T以外の細胞でもセンダイウイルスベクターの回収が出来るかどうかを検討するために、LLC-MK2, BHK-21, BHK/T7, 293T細胞で回収することが出来るかを試みた。各細胞をトランスフェクションする前日に6 well plateに蒔いた(LLC-MK細胞: $5 \times 10^5$  cells/well, BHK-21細胞: $2.5 \times 10^5$  cells/well, BHK/T7細胞: $2.5 \times 10^5$  cells/well, 293T細胞: $1.0 \times 10^6$  cells/well)。トランスフェクションは以下の様に行った。Opti-MEM 30 $\mu$ lにTransIT-LT1(Mirus)を15 $\mu$ lを混合し、室温で10~15分間培養した。この間にDNA溶液を調整した。Opti-MEMに20 $\mu$ lにpCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pSeV/ $\Delta$ F-GFPをそれぞれ 0.5 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 2 $\mu$ gを溶解した(ただし、BHK/T7細胞を使用する時はpCAGGS-T7は添加していない)。10~15分後にTransIT-LT1溶液とDNA溶液を混合し室温で15分間静置した。この間に細胞の培地抜いて新しい10% FBS入りのD-MEMを1ml/wellで静かに添加した。15分後、Opti-MEM (GIBCO) 500 $\mu$ lをDNA-TransIT-LT1 混合物に加え、全量を細胞に添加して培養した。37℃、5% CO<sub>2</sub>下で72時間培養後、培養液を捨て、Try-MEMに $1 \times 10^6$  cells/mlになるように懸濁したLLC-MK2/F7/A細胞を1 ml/well で重層し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。それから24時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1ml加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。48時間後に培養液1 mlを回収し、新しいTry-MEMを1ml加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。72時間後に培養液1 mlを回収した。回収した培養液は、7.5% BSAを133 $\mu$ l 加え（最終濃度1% BSA）、CIUを測定するまで-80℃で保存した。n=3で行った。その結果、テストした全ての細胞種からベクターが回収された。ベクターの回収効率はBHK/T7細胞>BHK-21細胞>293T細胞>LLC-MK2細胞の順であった(図18)。また、BHK/T7発現株にはpCAGGS-T7はトランスフェクションしていないことから、T7発現株において、CAG promoterを使用してもF欠失型SeV/ $\Delta$ F-GFPの回収が可能であることが示された。

#### 【0116】

[実施例9] furin認識配列を含むF蛋白を誘導発現するパッケージング細胞のクローニング

ヒト細胞であるHeLa細胞について、パッケージング細胞の作出を試みた。トランスフェクションにはLipofectAMINE PLUS reagent (Invitrogen, Groningen, Netherlands)を用いプロトコールに記載の方法で行った。即ち以下の方法で行った。HeLa細胞を $2 \times 10^5$  cells/dishで6 wellプレートに播き、10% FBSを含むD-MEMで24時間培養した。pCALNDLw-Zeo-F(furin) 或いはpCALNDLw-Zeo-F(5R)の1.5 $\mu$ gをFBS及び抗生物質を含まないD-MEMに希釈し(総量で94 $\mu$ L)、攪拌後LipofectAMINE PLUS reagent 6 $\mu$ Lを添加、再度攪拌し室温で15

分間放置した。放置後、予めLipofectAMINE reagent 4  $\mu$ LをFBS及び抗生物質を含まないD-MEMに希釈したものを(総量で100  $\mu$ L)添加し室温で15分間放置した。放置後、FBS及び抗生物質を含まないD-MEMを1 mL添加し攪拌後、PBSで1回洗浄したHeLa細胞へこのトランスフェクション混合液を添加した。37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで3時間培養後、トランスフェクション混合液を除去することなく、20% FBSを含むD-MEMを1mL添加し24時間培養した。培養後、トリプシンで細胞を剥がし、96 wellプレートに約5 cells/well或いは25 cells/wellの割合で希釈し、500  $\mu$ g/mLのZeocin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含む10% FBS入りのD-MEMで約2週間培養した。単一の細胞から広がったクローンを6wellプレートまで拡大培養した。このようにして調整したクローンについて解析を行った。

#### 【0117】

得られたクローンについて、F蛋白の発現量をWestern-blottingで半定量的に解析した。各クローンを6 wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの状態、5% FBSを含むMEMで希釈したCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルス (AxCANCre) をSaitoらの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) でMOI=5で感染させた。32 $^{\circ}$ Cで2日間培養後、培養上清を除去しPBSで1回洗浄し、セルスクレーパーで細胞を剥がして細胞を回収した。1 laneあたりこの1/10量をアプライしてSDS-PAGEを行った後、抗F抗体 ( $\gamma$  236: Segawa, H. et al., J. Biochem. 123, 1064-1072 (1998)) を利用したWestern-blottingを行うことで、細胞内のF蛋白質を半定量的に解析した。上記Western-blottingは以下の方法で行った。6 wellプレートの1 wellから回収した細胞を-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存後、1xに希釈したSDS-PAGE用サンプルバッファー (Red Loading Buffer Pack; New England Biolabs, Beverly, MA) 100  $\mu$ Lで溶解し、98 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。遠心後、上清10  $\mu$ LをSDS-PAGEゲル (マルチゲル10/20; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd, Tokyo, Japan) にロードした。15 mMで2.5時間泳動後、PVDF膜 (Immobilon PVDF transfer membrane; Millipore, Bedford, MA) にセミドライ法にて100mAで1時間転写した。転写膜をブロッキング溶液 (Block Ace; Snow Brand Milk Products Co., Ltd, Sapporo, Japan) で4 $^{\circ}$ C 1時間以上放置した後、10% Block Aceを含み抗F抗体を1/1000容量添加した一次抗体溶液に浸し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。0.05% Tween20を含むTBS (TBST) で3回、更にTBSで3回洗浄した後、10% Block Aceを含みHRPを結合した抗マウスIgG+IgM抗体 (Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Mouse IgG+IgM, HRP; BioSource Int., Camarillo, CA) を1/5000容量添加した二次抗体溶液に浸し、室温で1時間振盪した。TBSTで3回、TBSで3回洗浄した後、化学発光法 (ECL western blotting detection reagents; Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden) により検出した。得られたクローンの中で比較的F蛋白の発現量の多かったものとして、pCALNdLw-Zeo-F(furin) 或いはpCALNdLw-Zeo-F(5R)を遺伝子導入した細胞について、それぞれ31クローン及び23クローンが得られた。

#### 【0118】

これらのクローンについて、実際にF遺伝子欠失型SeV (SeV/ $\Delta$ F) のウイルス生産性を調べた。まず簡便な方法として、GFP遺伝子を搭載したSeV/ $\Delta$ F (SeV/ $\Delta$ F-GFP) を感染し、そのGFP蛍光の広がりを調べた。具体的には、それぞれのクローンの細胞を6well plateに播き37 $^{\circ}$ Cで培養した。上述の方法 (AxCANCre感染) によりF蛋白の発現を誘導後、32 $^{\circ}$ Cに移行させ、感染1日後にGFP遺伝子を搭載したSeV/ $\Delta$ F (SeV/ $\Delta$ F-GFP) をMOI=0.1で感染し、経時的にGFP蛍光の広がりを蛍光顕微鏡下で観察した。GFP蛍光の広がりが観察されたのは、pCALNdLw-Zeo-F(furin) 或いは pCALNdLw-Zeo-F(5R) を遺伝子導入したクローンについて、それぞれ8クローン及び12クローンであった。これらのクローンについては、実際にウイルス生産性を調べた。SeV/ $\Delta$ F-GFPをMOI=0.5で感染後、10% FBS存在下或いは非存在下32 $^{\circ}$ Cで培養し、感染3日後に培養上清中のウイルスタイターを調べた。全てのクローンでFBS非存在下よりも10% FBS存在下の方が10~20倍高いタイターが得られた。特に、クローンF5R2の場合に生産性が高く、10% FBS存在下で $3 \times 10^6$  CIU/mlの SeV/ $\Delta$ F-GFPが回収された。従来パッケージング細胞としては使用出来なかったHeLa細胞を使用した場合もSeV/ $\Delta$ Fを生産可能であることが確認され、trypsin添加なしで、また血清存在下でのSeV/

ΔFの生産に成功した。

【0119】

[実施例10] ベクター生産性向上の試み

クローンF5R2のベクター生産性は比較的高い ( $3 \times 10^6$  CIU/ml) もの、実際のベクター生産に利用するためには、更に生産性を向上させる必要がある。F5R2で生産したSeVベクター (SeV/ΔF-GFP) について、F蛋白の開裂の程度をWestern-blottingにより調べた。この時、抗F1抗体を利用した。抗F1抗体は、新たに調製したポリクローナル抗体であり、F1蛋白質の1-8 (FFGAVIGT+Cys/配列番号: 52), 27-39 (EAREAKRDIALIK/配列番号: 53) 及び285-297 (CGTGRRPISQDRS/配列番号: 54) の合成ペプチドを3種混合して免疫したウサギ血清から調製したものである。抗F1抗体は、F0及びF1の両者の検出が可能な抗体である。実施例9の場合と同様の方法でF蛋白の発現誘導及びベクター生産を行った。また、Western-blottingについては、一次抗体としてポリクローナル抗体の抗F1抗体を利用したので、二次抗体として、抗ラビットIgG抗体 (Anti-rabbit IgG (Goat) H+L conj.; ICN P., Aurola, OH) を使用した。F5R2細胞で生産したSeVベクター (SeV/ΔF-GFP) におけるF蛋白の検出結果を図19に示した。活性化したF蛋白質である F1の割合が比較的少ないことが明らかになった。

【0120】

より高いウイルス生産能を持つ改変F蛋白質発現細胞を得るため、F5R2の細胞のリクローニングを実施し、F1への開裂の頻度が上昇した細胞の選択を行った。32クローンが得られ、ベクター生産性を精査した所、クローンF5R2-F22が最も高い生産性を示した。SeV/ΔF-GFPをMOI=0.5で感染後、10% FBS存在下32℃で培養し、経時的に培養上清中のSeV/ΔF-GFPのタイターを調べた結果を図20に示した。リクローニングしたF5R2-F22は親細胞であるF5R2よりも10倍以上の生産性を示し、感染3日目には  $8 \times 10^7$  CIU/mlのSeV/ΔF-GFPを生産することが可能であった。この細胞 (クローンF5R2-F22) についても、生産したSeVベクター (SeV/ΔF-GFP) におけるF蛋白の開裂の程度を、抗F1抗体を利用したWestern-blottingにより調べた。F5R2細胞の場合よりもF1への開裂の程度が上昇していることが明らかになった (図21)。このことが生産性 (=感染性ウイルス粒子の産出) の向上に寄与しているものと考えられた。更に生産性を上げる方法として、例えば、ヒトfurin遺伝子或いは類似の活性を有する蛋白質の遺伝子を導入し、furin様活性を上昇させることが考えられる。生産したSeVベクター (SeV/ΔF-GFP) 中のF蛋白質量は比較的多いので、F0蛋白の開裂を促進し、活性型F蛋白 (F1蛋白) の比率を上げることで、更に生産性を向上できるものと期待される。

【産業上の利用可能性】

【0121】

本発明の方法によれば、ウイルスの増殖に本来必要なプロテアーゼを用いずに、そのウイルスを製造することが可能となる。ウイルス生産細胞が内因的に発現するプロテアーゼ、または細胞に有害な効果の少ないプロテアーゼの切断配列を用いることで、ウイルス製造のための細胞の選択の幅が広がり、ウイルス製造の効率を高めることができる。本発明の方法は、遺伝子治療用ベクターを含む所望の遺伝子導入ベクターの製造方法として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】 センダイウイルスF蛋白質の活性化部位の配列の模式図である。

【図2】 F遺伝子活性化部位にfurin認識配列 (F(furin): R-Q-K-R) を有するF遺伝子発現プラスミドの構築スキームを示す図である。

【図3】 F遺伝子活性化部位にfurin認識配列 (F(5R): (R)-R-R-R-R) を有するF遺伝子発現プラスミドの構築スキームを示す図である。

【図4】 pCAGGS(B type)およびpCAGGS(BSX)の構築手順を示す図である。

【図5】 pCALNdLWE-zeo-NP(Z)の構築手順を示す図である。

【図6】 pCAGGS-P4C(-)の構築手順を示す図である。

- 【図 7】 pCAGGS-L(TDK)の構築手順を示す図である。
- 【図 8】 pCAGGS-Fの構築手順を示す図である。
- 【図 9】 pCAGGS-T7の構築手順を示す図である。
- 【図 1 0】 pCAGGS-SeVおよびpCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFPの構築手順を示す図である。
- 【図 1 1】 pCAGGS-SeVおよびpCAGGS-SeV/ $\Delta$ F-GFPの構築手順を示す図である（図 1 0 から続く）。
- 【図 1 2】 pCAGGS-SeVの構築手順を示す図である（図 1 1 から続く）。
- 【図 1 3】 HamRbz法においてゲノムDNAの量を変化させた場合のSeV/ $\Delta$ F-GFPの回収効率をCIUアッセイにより検討した結果を示す図である。2  $\mu$ g以上でほとんど変化はない。
- 【図 1 4】 HamRbz法によるSeV/ $\Delta$ F-GFPの回収時におけるpCAGGS-FとpCAGGS-F5Rの回収効率の検討を行った結果を示す図である。pCAGGS-F5Rを使用した場合の方が、回収効率ははるかに向上した。
- 【図 1 5】 pCAGGS-T7法により回収した伝播型SeV (SeV(TDK)18+GFP) のHAアッセイの結果を示す写真である。BHK-21, BHK/T7, 293Tで希釈しないで鶏卵に接種した時のみHA活性が検出された。
- 【図 1 6】 pCAGGS-T7法においてゲノムDNAの量を変化させた場合のSeV/ $\Delta$ F-GFPの回収効率をCIUアッセイにより検討した結果を示す図である。0.5~5.0  $\mu$ gでほとんど変化はないが、5  $\mu$ gを使用した時に最も回収効率が高かった。
- 【図 1 7】 pCAGGS-T7法において導入試薬を変化させた場合のSeV18+GFP/ $\Delta$ Fの回収効率をCIUアッセイにより検討した結果を示す図である。リン酸カルシウムを使用した場合にはTransIT-LT-1を使用した場合と同等以上の回収効率を示した。
- 【図 1 8】 pCAGGS-T7法において細胞種を変化させた場合のSeV/ $\Delta$ F-GFPの回収効率をCIUアッセイにより検討した結果を示す図である。試験した全ての細胞からウイルスが回収された。回収効率はBHK/T7>BHK-21>293T>LLC-MK2の順だった。（但し、BHK/T7を使用する場合はpCAGGS-T7は添加していない。）
- 【図 1 9】 クローンF5R2のパッケージング細胞より生産したF遺伝子欠失型SeVベクターのウイルス粒子中のF蛋白質を、抗F1抗体を利用したWestern-blottingにより検出した結果を示す図である。
- 【図 2 0】 クローンF5R2及びクローンF5R2-F22のパッケージング細胞より産生される、F遺伝子欠失型SeVベクター (SeV/ $\Delta$ F-GFP) の経時的な感染性粒子生産量を示す図である。
- 【図 2 1】 クローンF5R2及びクローンF5R2-F22のパッケージング細胞より生産したF遺伝子欠失型SeVベクターのウイルス粒子中のF蛋白質を、抗F1抗体を利用したWestern-blottingにより検出した結果を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for producing virus vectors

<130> D3-A0401

<160> 54

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 1

Pro Leu Gly Met Thr Ser

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 2

Pro Gln Gly Met Thr Ser

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 3

Pro Leu Gly Leu Trp Ala Arg

1 5

<210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 4  
Gly Pro Leu Gly Met Arg Gly Leu  
1 5

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 5  
Pro Gln Gly Leu Glu Ala Lys  
1 5

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 6  
Arg Pro Lys Pro Val Glu Trp Arg Glu Ala Lys  
1 5 10

<210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> PLALWAR

<400> 7

Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg  
1 5

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 8  
Pro Leu Gly Met Trp Ser  
1 5

<210> 9  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 9  
Pro Leu Gly Leu Gly  
1 5

<210> 10  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 10  
Val Phe Ser Ile Pro Leu  
1 5

<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence



<400> 11  
Ile Lys Tyr His Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 12  
Val Pro Met Ser Met Arg Gly Gly  
1 5

<210> 13  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 13  
Arg Pro Phe Ser Met Ile Met Gly  
1 5

<210> 14  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of protease cleavage sequence

<400> 14  
Val Pro Leu Ser Leu Thr Met Gly  
1 5

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of protease cleavage sequence

&lt;400&gt; 15

Ile Pro Glu Ser Leu Arg Ala Gly

1

5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of protease cleavage sequence

&lt;400&gt; 16

Pro Leu Ala Tyr Trp Ala Arg

1

5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 367

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Cytomegalovirus

&lt;400&gt; 17

actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc	60
cgcggttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca	120
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	180
caatgggtgg agtatattacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag	300
tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	360
accatgg	367

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1248

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Gallus gallus

&lt;400&gt; 18

tcgaggtgag cccacgttc tgcttcactc tcccacatctc cccccctcc ccacccccaa	60
ttttgtatit atttatitit taattatitit gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg	120
ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcgggggcg agggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg	180
cggcggcgagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtittc ttttatggcg aggcggcggc	240
ggcgggcgcc ctataaaaag cgaagcgcg cggcgggcggg gagtcgctgc gacgctgcct	300
tcgccccgtg ccccgctccg ccgcccctc gcgcgcgccg ccccggtct gactgaccgc	360
gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct ccgggctgta attagcgctt	420
ggtttaaatga cggcttgitt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttgagg ggctccggga	480

```

gggccctttg tgcgggggga gcggctcggg ggggtgcgtgc gtgtgtgtgt gcgtggggag 540
cgccgcgtgc ggctccgcgc tgcccggcgg ctgtgagcgc tgcgggcgcg gcgcggggct 600
ttgtgcgctc cgcagtgtgc gcgaggggag cgcggccggg ggcggtgccc cgcggtgcgg 660
ggggggctgc gaggggaaca aaggctgcgt gcggggtgtg tgcgtggggg ggtgagcagg 720
gggtgtgggc gcgtcggctg ggctgcaacc cccctgcac cccctcccc gagttgctga 780
gcacggcccg gcttcgggtg cggggctccg tacggggcgt ggcgcggggc tcgccgtgcc 840
gggcgggggg tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg gggccgcctc gggccgggga 900
gggctcgggg gaggggcgcg gcggccccc gagcgccggc ggctgtcgag gcgcggcgag 960
ccgcagccat tgccttttat ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtccca 1020
aatctgtgcg gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgcacc ccctctagcg ggcgcggggc 1080
gaagcggtag ggcgcgggca ggaaggaaat gggcggggag ggccttcgtg cgtcgccgcg 1140
ccgccgtccc cttctccctc tccagcctcg gggctgtccg cgggggggacg gctgccttcg 1200
ggggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcgg 1248

```

<210> 19  
 <211> 95  
 <212> DNA  
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

```

<400> 19
cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg 60
ttattgtgct gtctcatcat tttggcaaag aattc 95

```

<210> 20  
 <211> 1744  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> an example of CA promoter

```

<400> 20
actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 60
cgcgttacat aacttacggt aaatggccc cctggctgac cgcccaacga ccccgccca 120
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 180
caatgggtgg agtatattac gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag 300
tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 360
accatggctg aggtgagccc cacgttctgc ttactctcc ccctctccc cccctccca 420
cccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 480
gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 540
agaggtgagg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccctt tatggcgagg 600
cggcgggcgg ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcggggag tcgctgcgac 660
gctgccttcg ccccgctgcc cgctccgcc ccgcctcgc ccgcccgcc cggtctgac 720
tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt 780
agcgcttggg ttaatgacgg cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc 840
tccgggaggg ccctttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg 900
tgggggagcg cgctgaggc tccgcgctgc ccggcggtg tgagcgctgc gggcgcggcg 960

```

cggggcctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc 1020  
 ggtgcggggg gggctgcgag gggaacaaag gctgcgtgcg ggggtgtgtgc gtgggggggt 1080  
 gagcaggggg tgtgggcgcg tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1140  
 ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg 1200  
 ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1260  
 ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg 1320  
 cggcgagccg cagccattgc cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt 1380  
 tgtcccaaat ctgtgcggag ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcacccc tctagcgggc 1440  
 gcggggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt 1500  
 cgccgcgccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct 1560  
 gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta 1620  
 gagcctctgc taacctgtt catgccttct tcttttctt acagctcctg ggcaacgtgc 1680  
 tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattcgg cttgatcgaa gcttgccac 1740  
 catg 1744

<210> 21  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Bacteriophage P1

<400> 21  
 ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat 34

<210> 22  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 22  
 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc 34

<210> 23  
 <211> 10  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> an example of Sendai virus S sequence (w= a or c; v= a or c or g)

<400> 23  
 ucccwvuwc 10

<210> 24  
 <211> 10  
 <212> RNA  
 <213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of Sendai virus S sequence

&lt;400&gt; 24

ucccaguuuc

10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of Sendai virus S sequence

&lt;400&gt; 25

ucccacuuac

10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of Sendai virus S sequence

&lt;400&gt; 26

ucccacuuuc

10

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an example of Sendai virus S sequence

&lt;400&gt; 27

agggtcaaag

10

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 28  
agggtgaatg

10

<210> 29  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 29  
agggtgaaag

10

<210> 30  
<211> 9  
<212> RNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of Sendai virus E sequence

<400> 30  
auucuuuuu

9

<210> 31  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an example of Sendai virus E sequence

<400> 31  
taagaaaaa

9

<210> 32  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 32  
cattttggca aagaattgat taattcgag 29

<210> 33  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 33  
tcacagcacc caagaatctc ttctggcgag caccggcatt ttgtgtc 47

<210> 34  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 34  
gacacaaaat gccggtgctc gccagaagag attcttgggt gctgtga 47

<210> 35  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 35  
gatcgtaatc acagtctctc gagagttgta ccattctacct ac 42

<210> 36  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 36  
tcacagcacc gaagaatctc ctccggcgac gaccggcatt ttgtgtcgta tc 52



<210> 37

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 37

gatacgcac aaaatgccgg tcgtcgccgg aggagattct tcggtgctgt ga 52

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 38

aaatcctgga gtgtcttttag agc 23

<210> 39

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 39

tctcgagtcg ctcggtacga tggccaagtt gaccagtgcc gttccggtgc tcac 54

<210> 40

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 40

aatgcatgat cagtaaatta caatgaacat cgaaccccag agtcccgctc agtcctgctc 60  
ctcggccacg aagtcacgc agttg 85

<210> 41  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 41  
ccggaattca acaaatggcc gggttgttga gcaccttcga 40

<210> 42  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 42  
ccggaattcc tagattcctc ctatcccagc tactgctgct cg 42

<210> 43  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 43  
ctagctagcc caccatggat caagatgcct tcattctaaa agaagattct 50

<210> 44  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 44  
ctagctagcc tagtttgtca gtgactctat gtcctcttct acgagttcca 50

<210> 45

<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 45  
ggccgcgtcg acatcgatgc tagcctcgag ccgcggtac 39

<210> 46  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 46  
cgcggtcga ggctagcatc gatgtcgacg c 31

<210> 47  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 47  
cttaactatg cggcatcaga gc 22

<210> 48  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 48  
gccgattcat taatgcagct gg 22

<210> 49  
<211> 37  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 49

ctataggaaa ggaattccta tagtcaccaa acaagag

37

<210> 50

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 50

gatgagtccg tgaggacgaa actataggaa aggaattc

38

<210> 51

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 51

gcggggccctc tcttgtttgg tctgatgagt ccgtgaggac

40

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 52

Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Cys

1

5

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 53

Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Lys	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys
1				5					10			

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

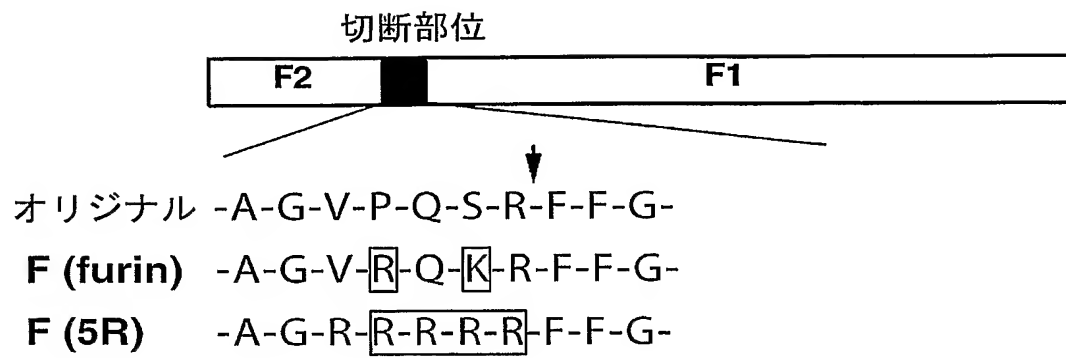
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 54

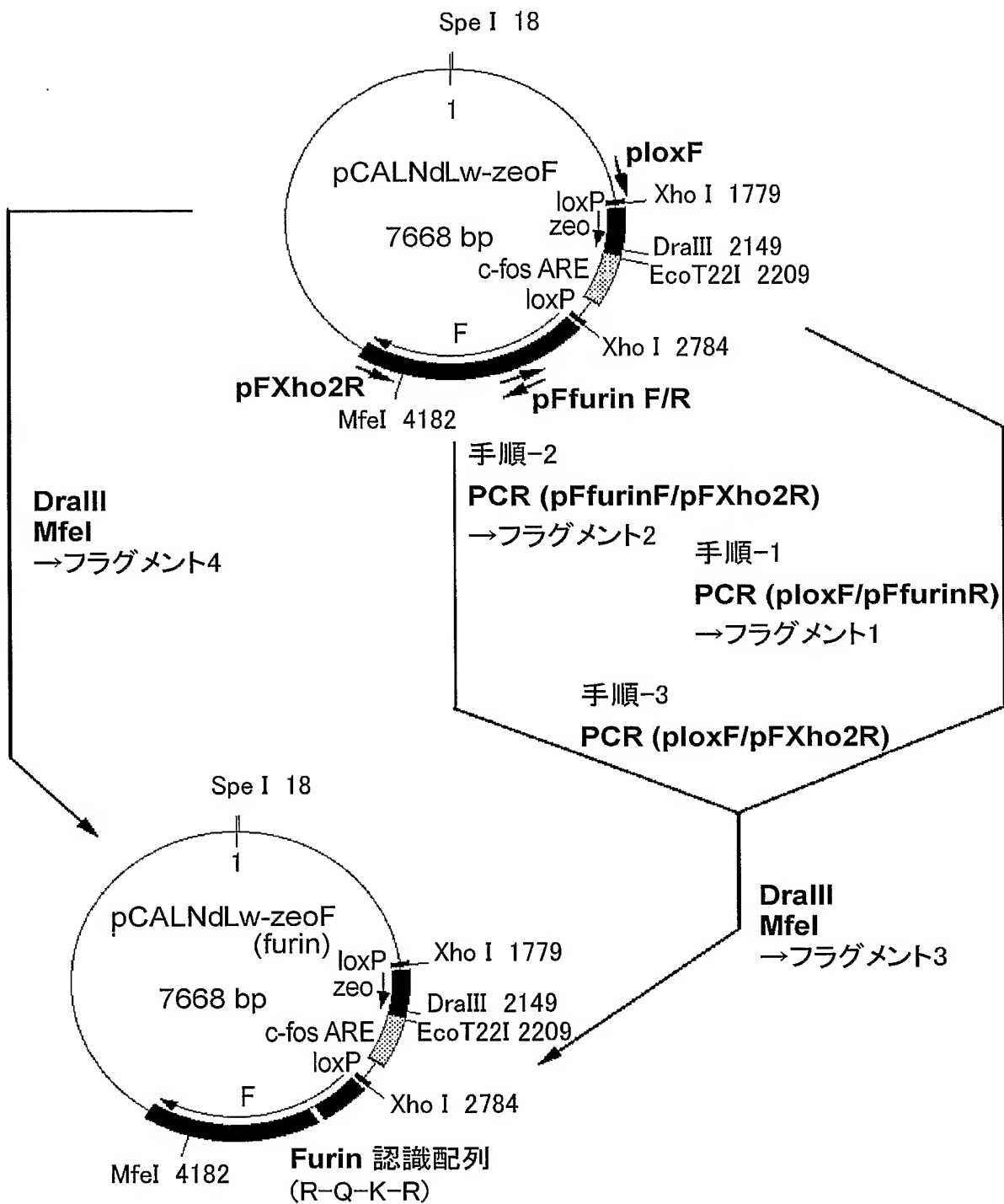
Cys	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Pro	Ile	Ser	Gln	Asp	Arg	Ser
1				5					10			

【書類名】 図面

【図 1】

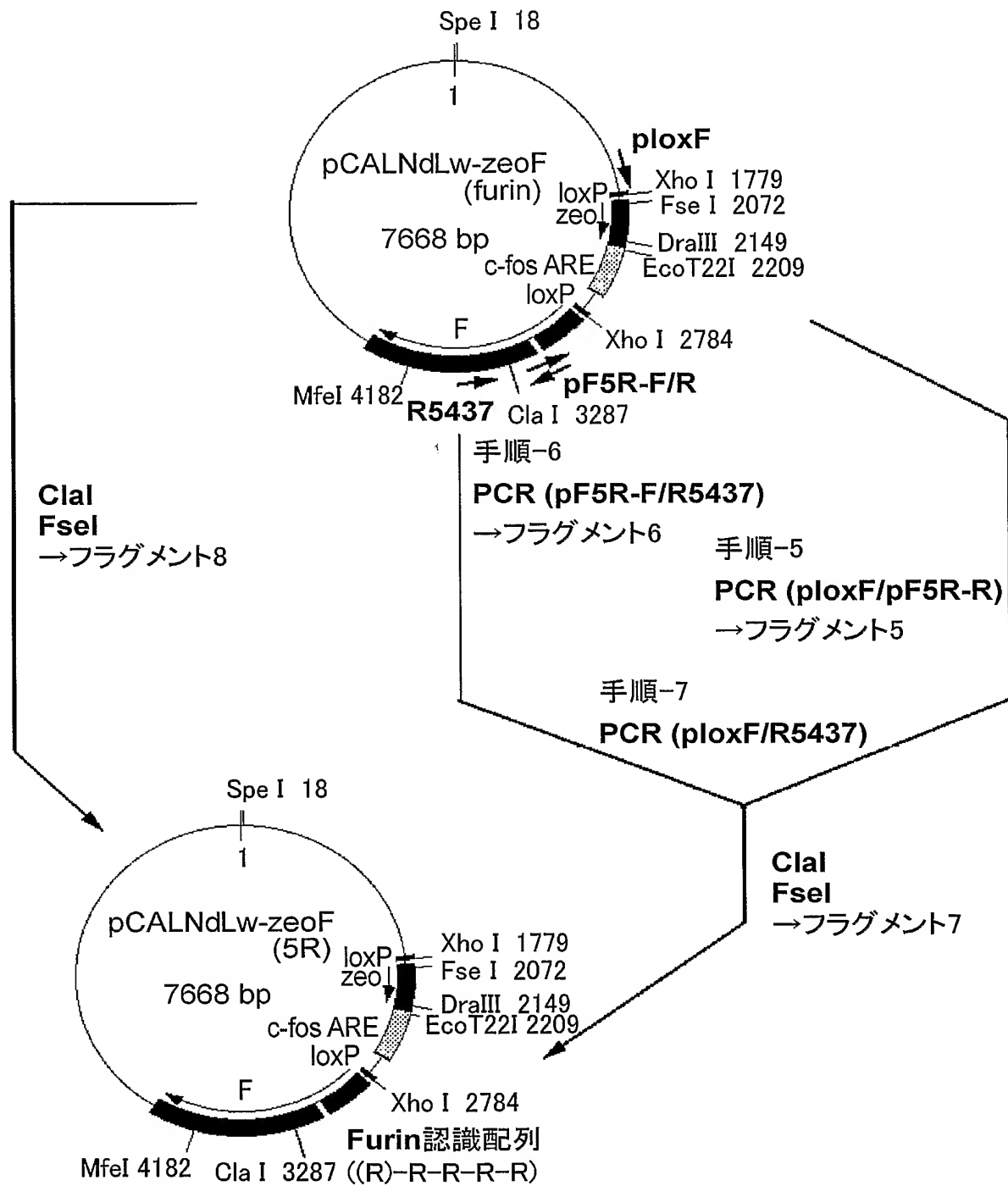


【図 2】

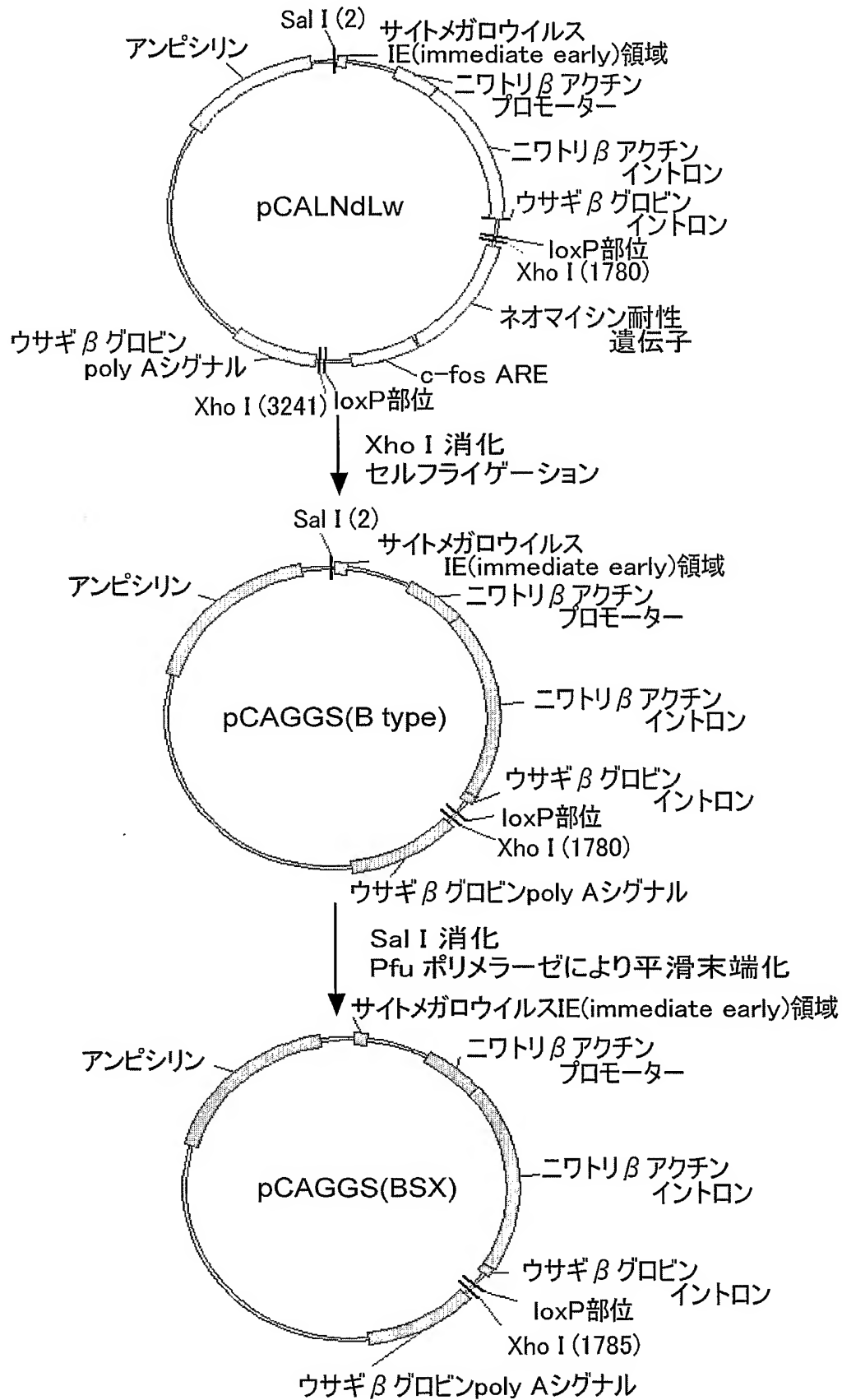




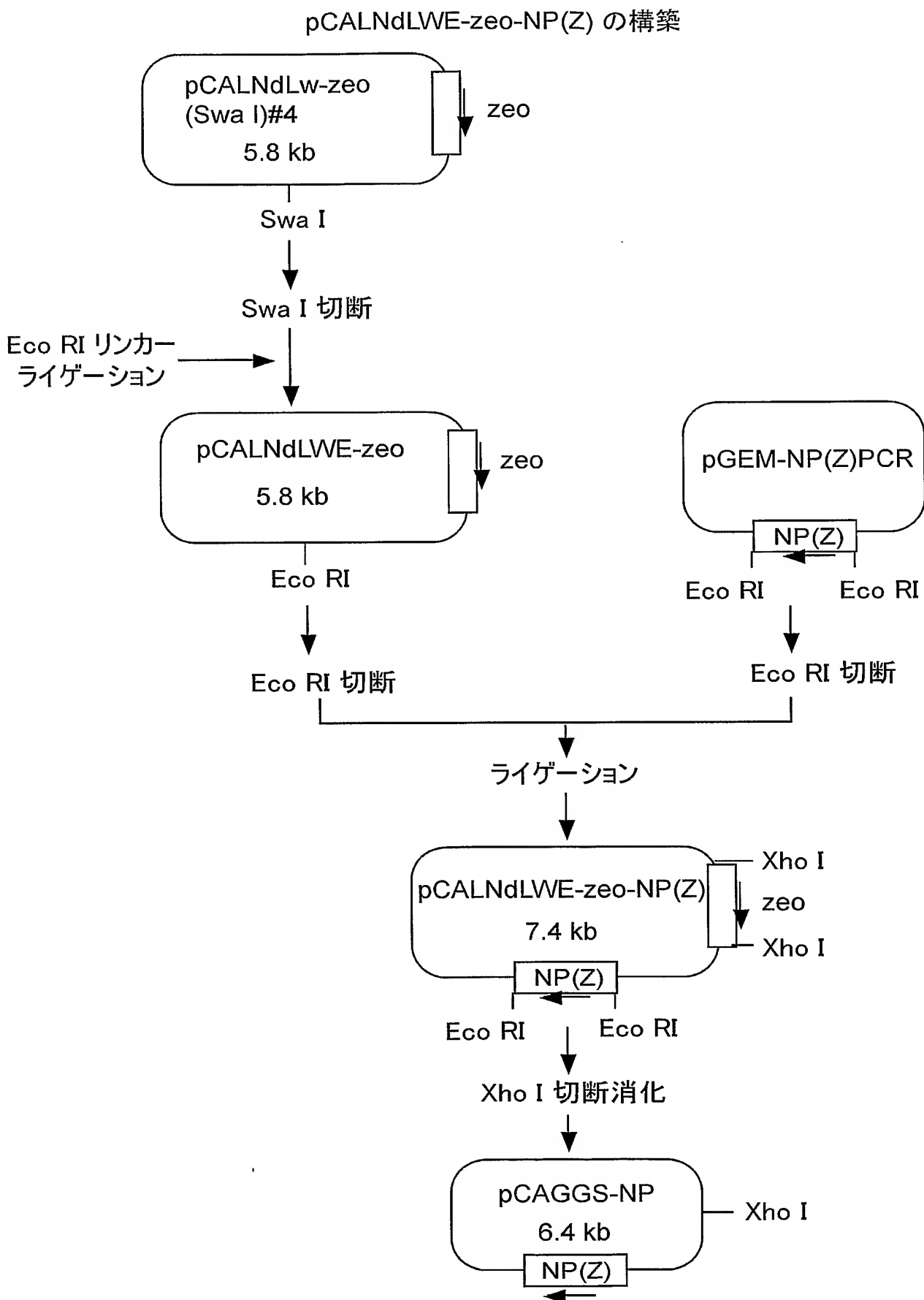
【図 3】



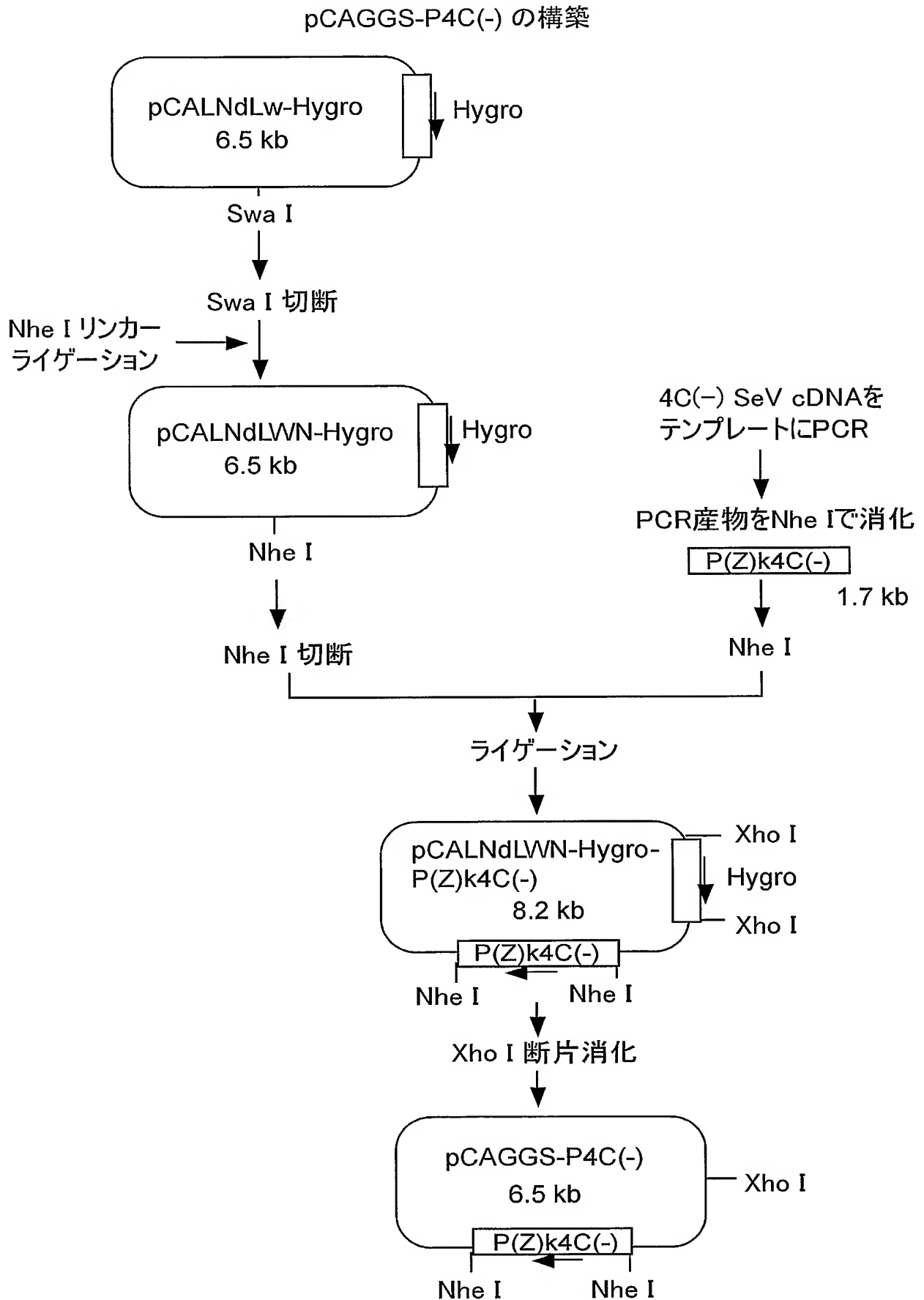
【図 4】  
pCAGGS(B type), pCAGGS(BSX) の構築



【図 5】

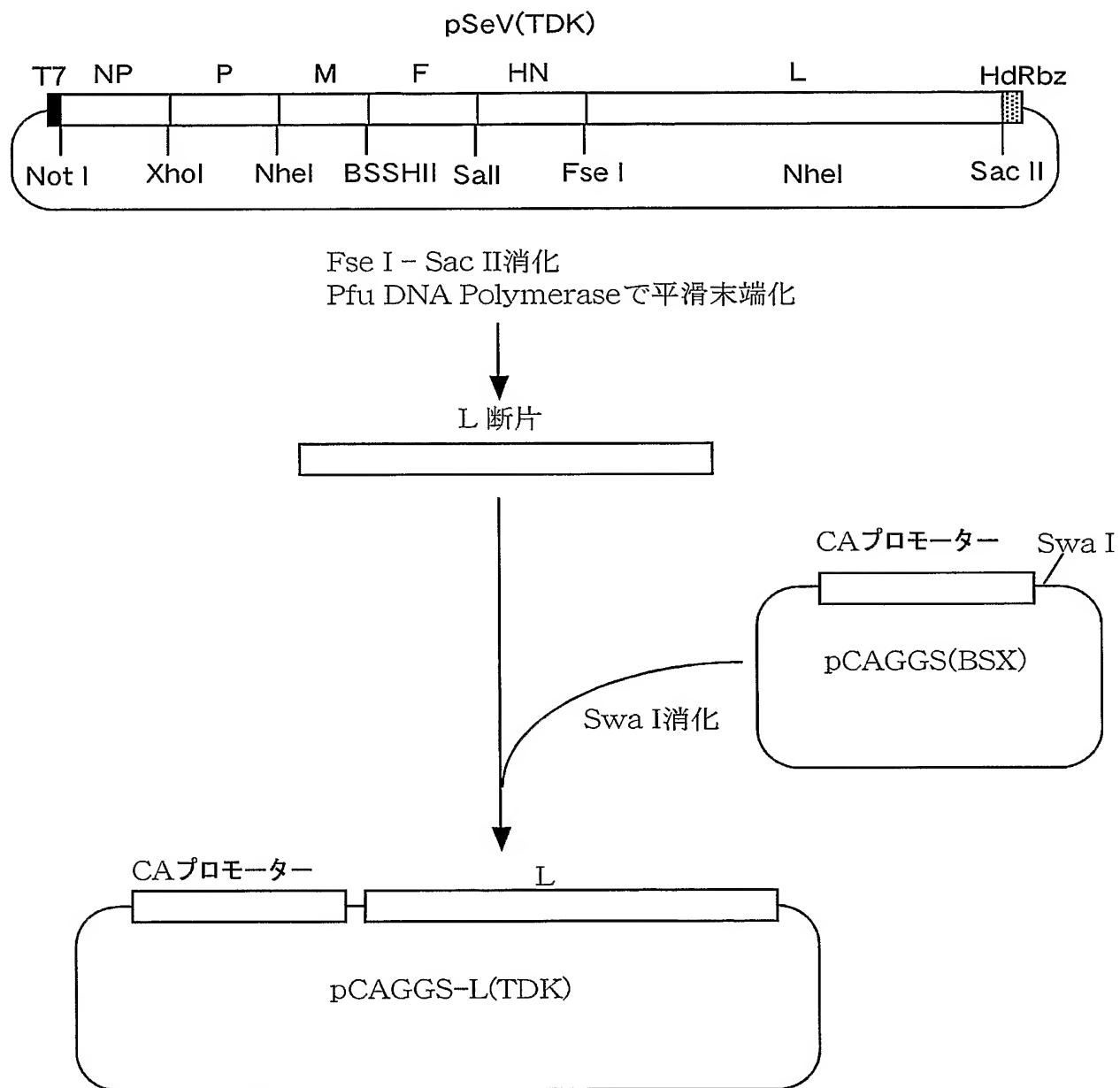


【図 6】



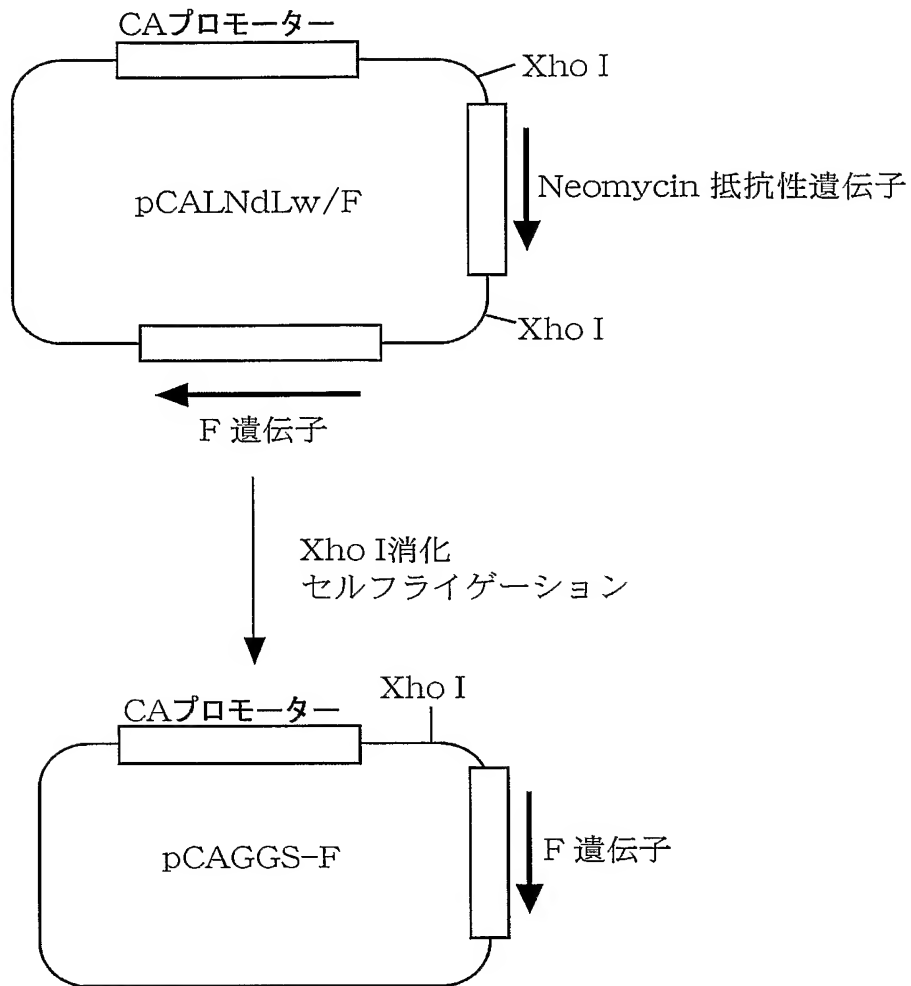
【図 7】

## pCAGGS-L(TDK)の構築

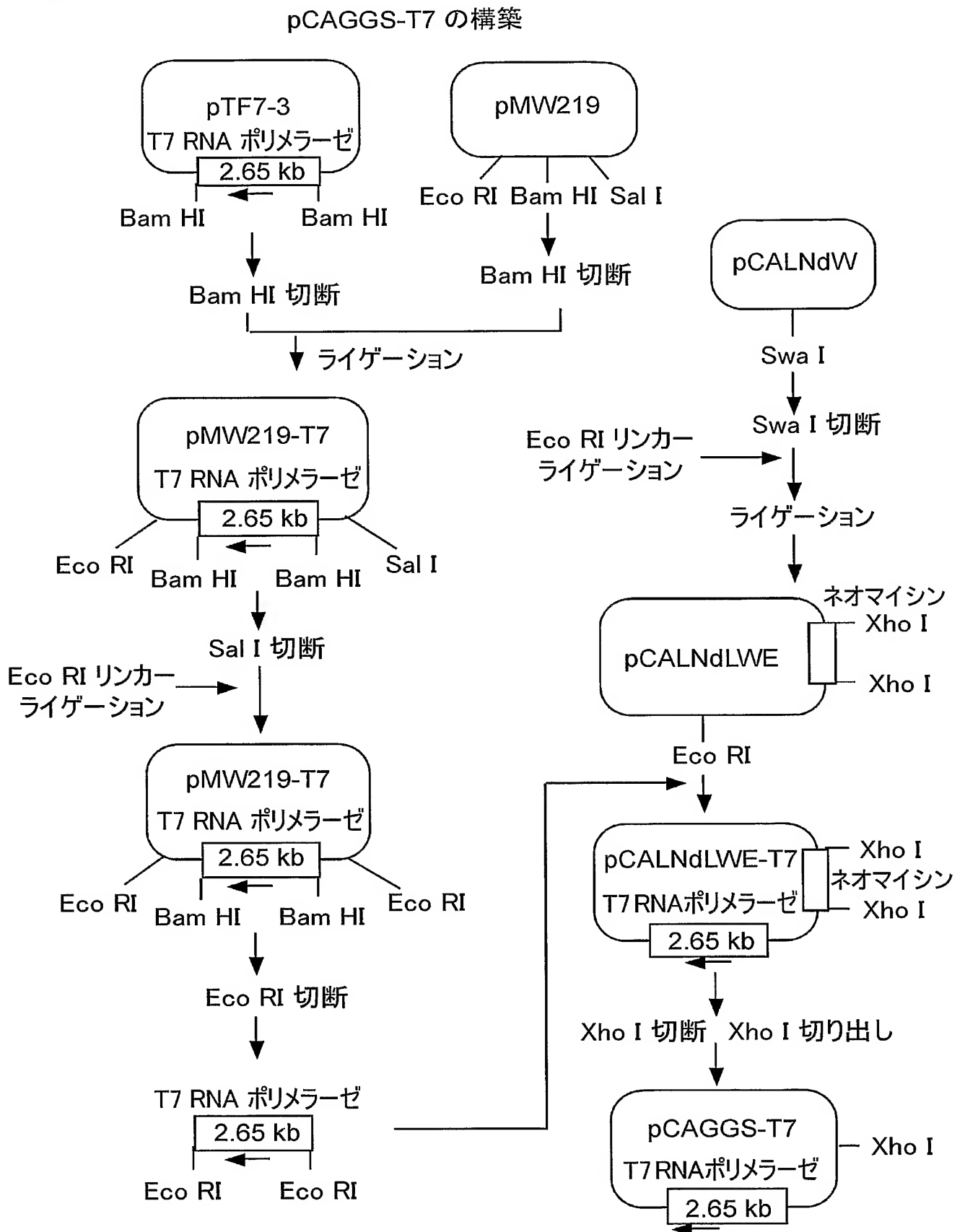


【図 8】

pCAGGS-Fの構築

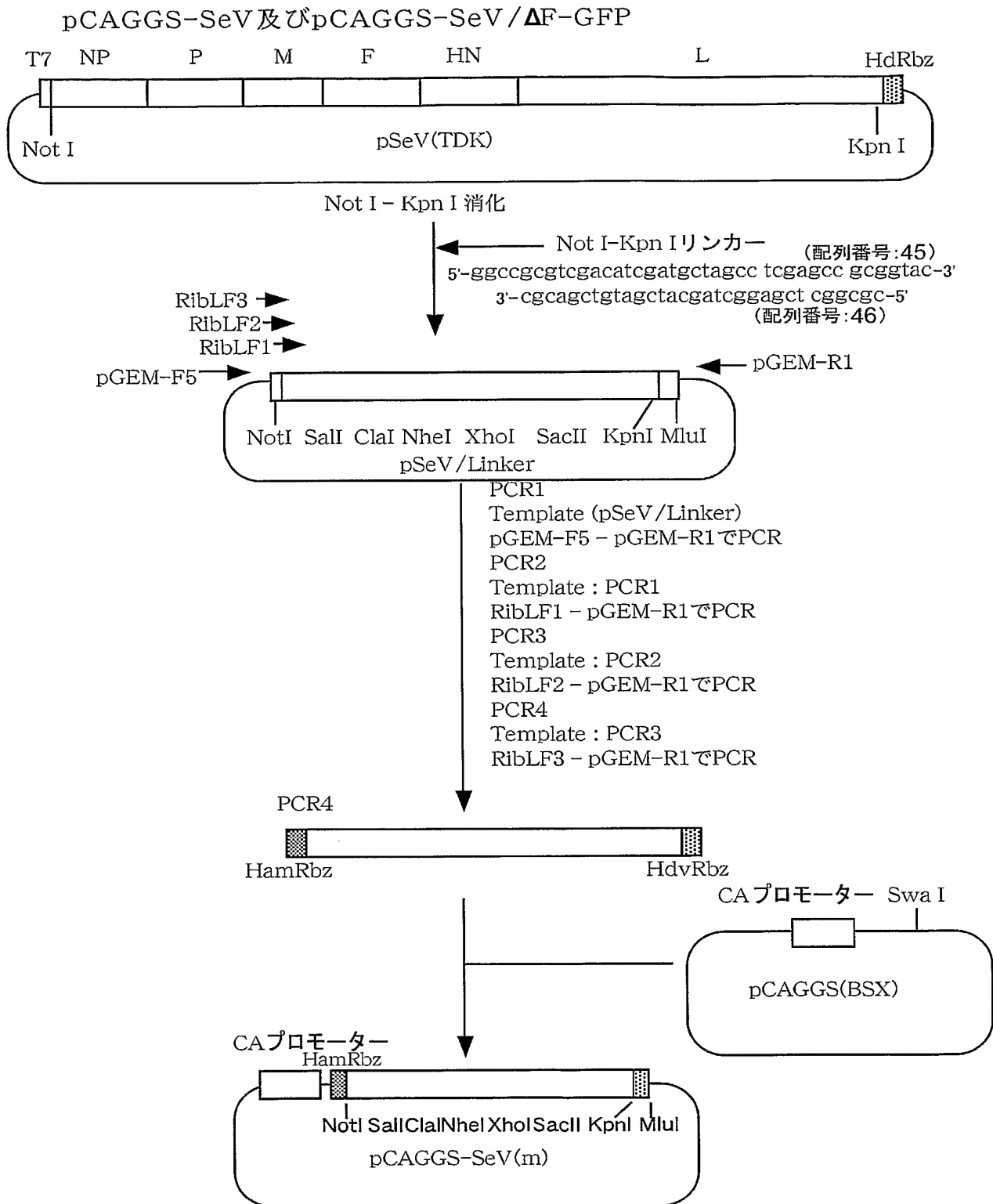


【図 9】

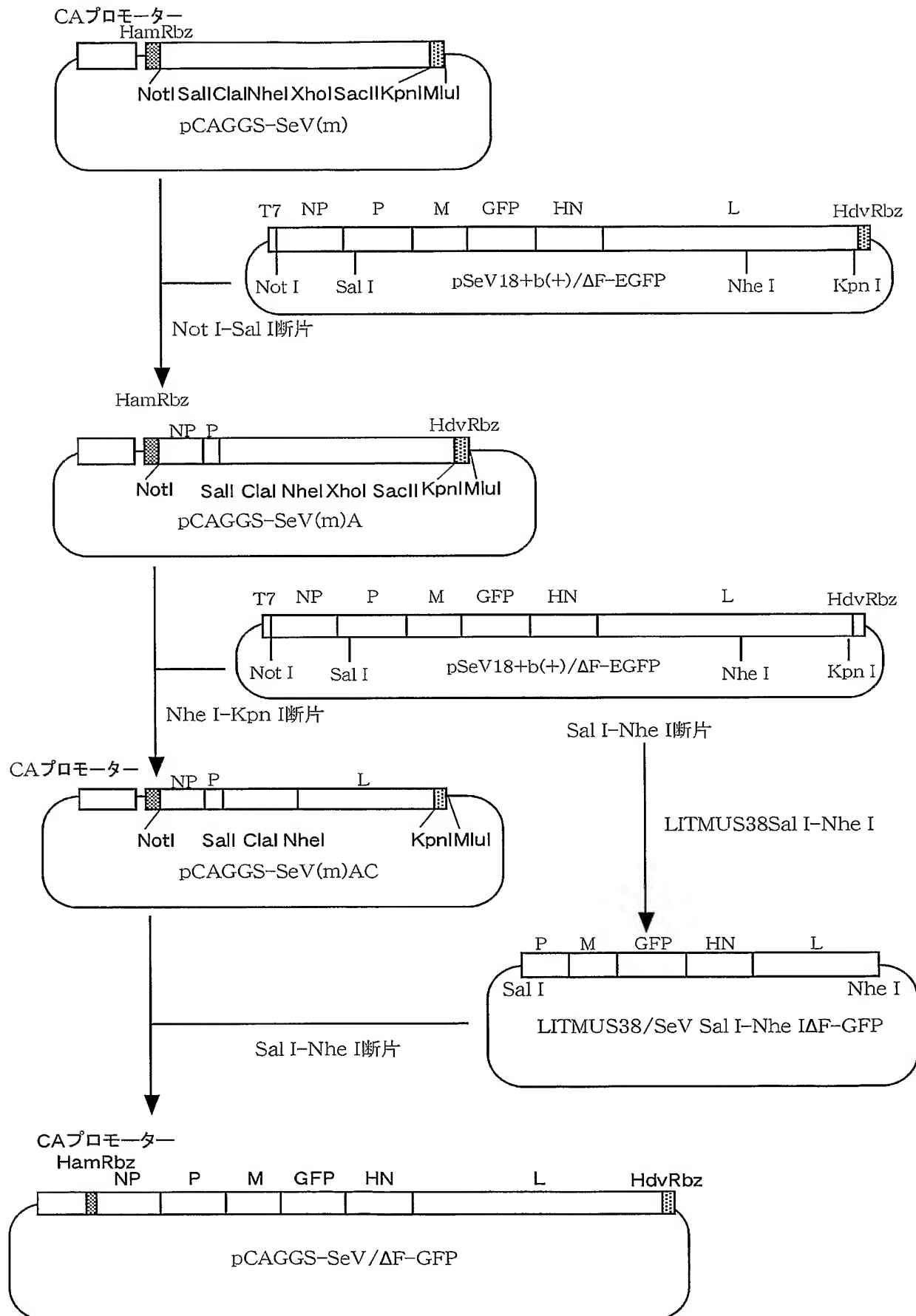




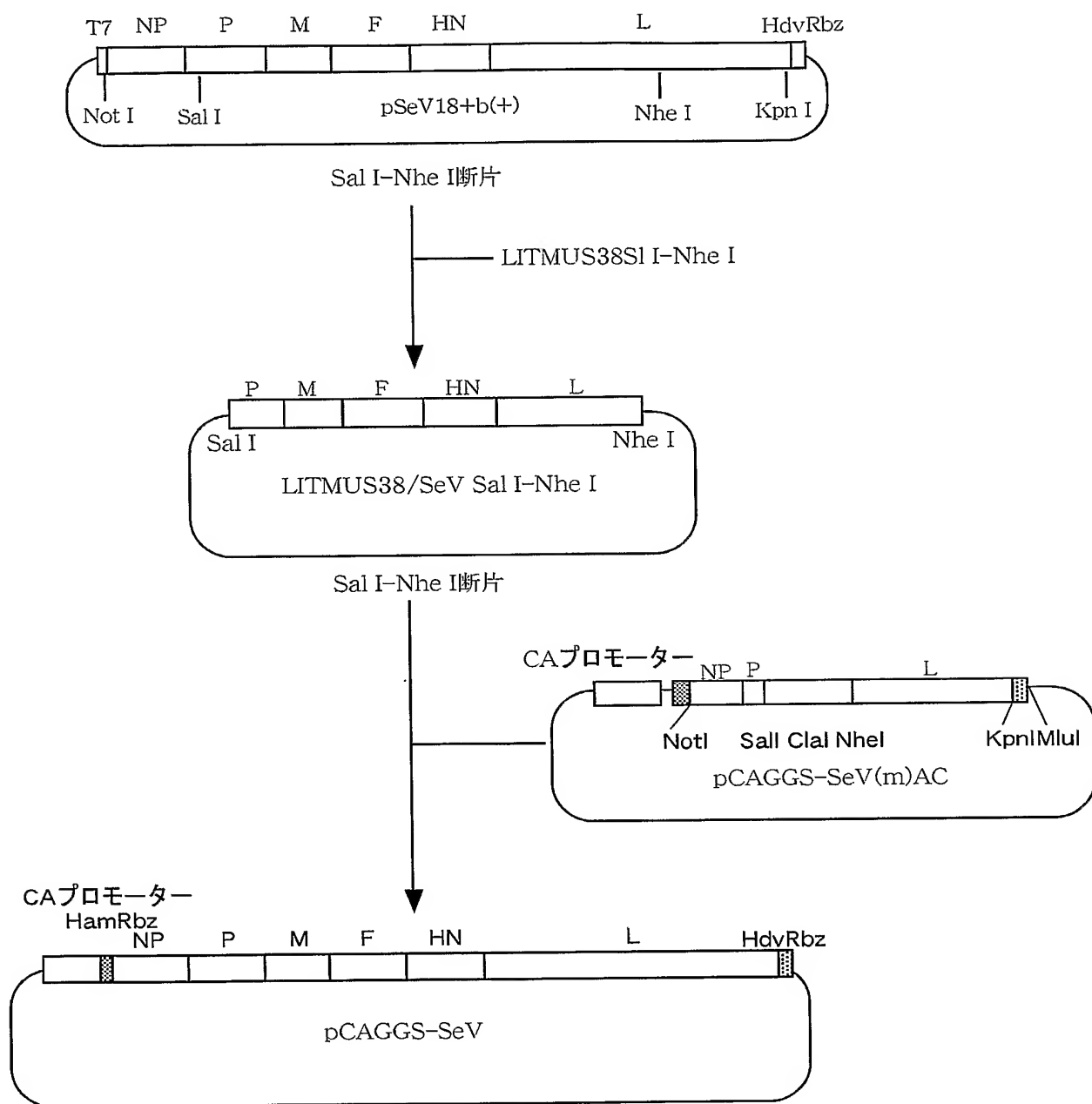
【図 10】



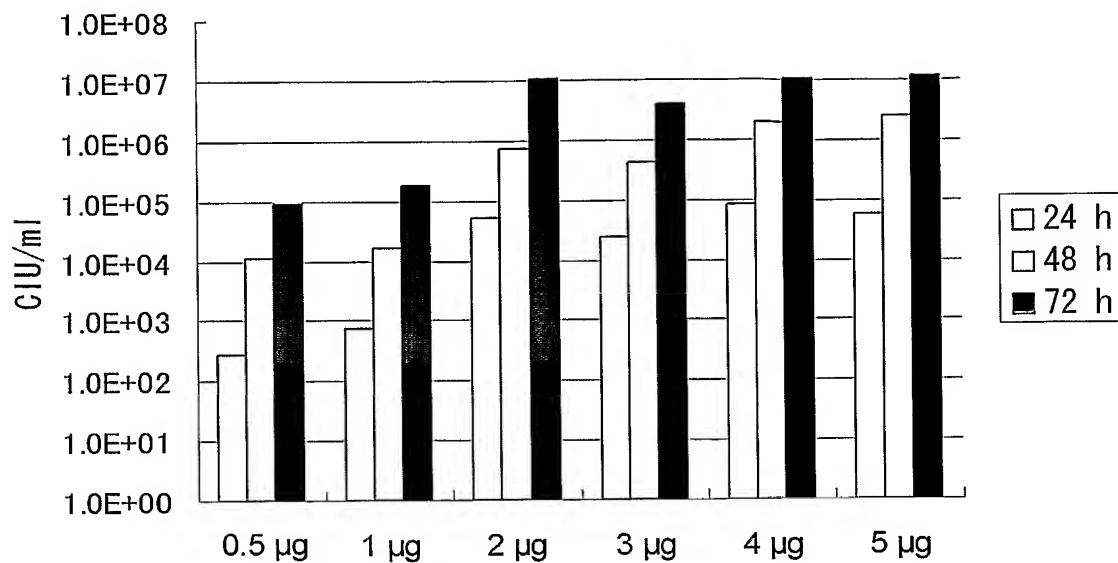
【図 11】



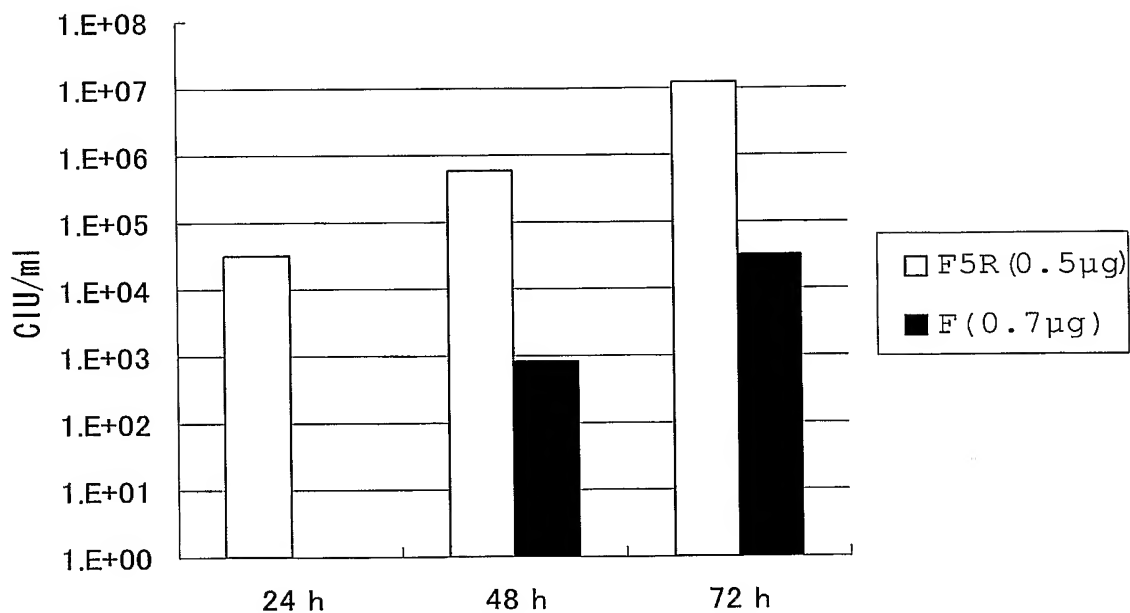
【図 12】



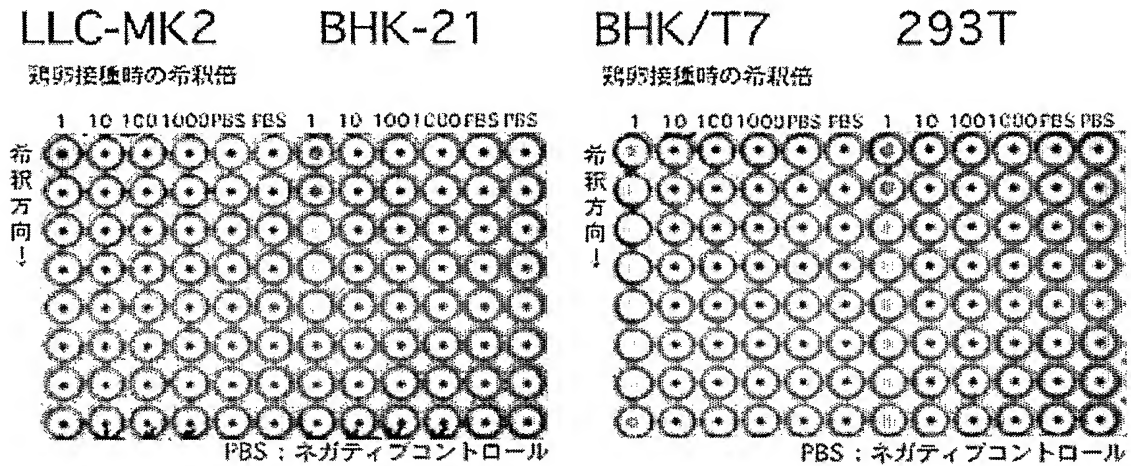
【図 1 3】



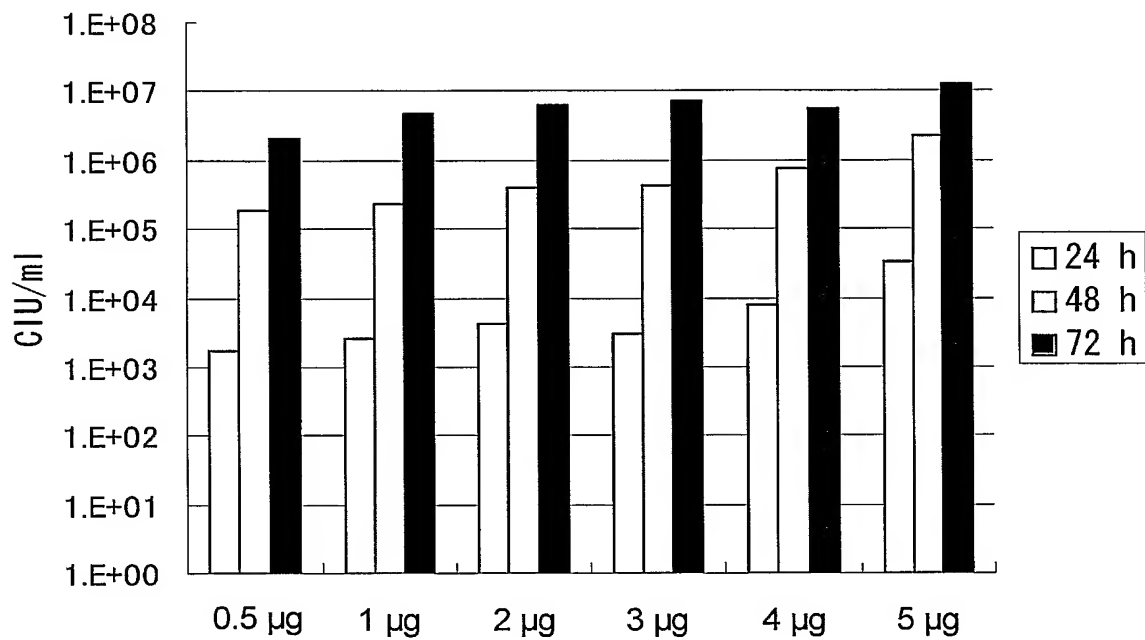
【図 1 4】



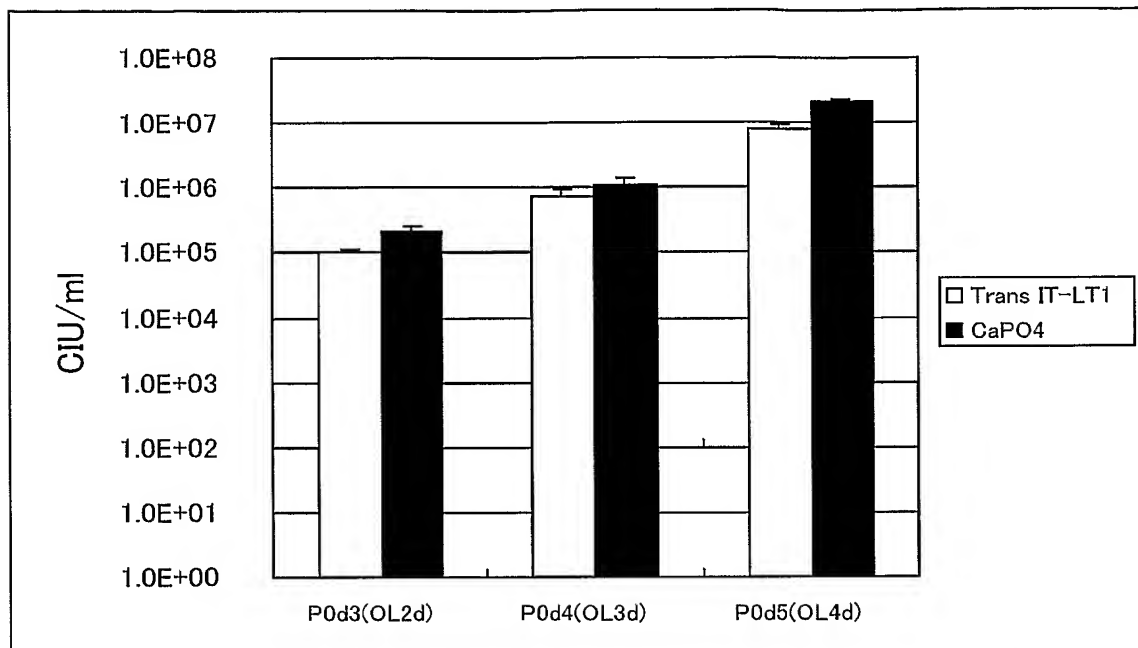
【図 15】



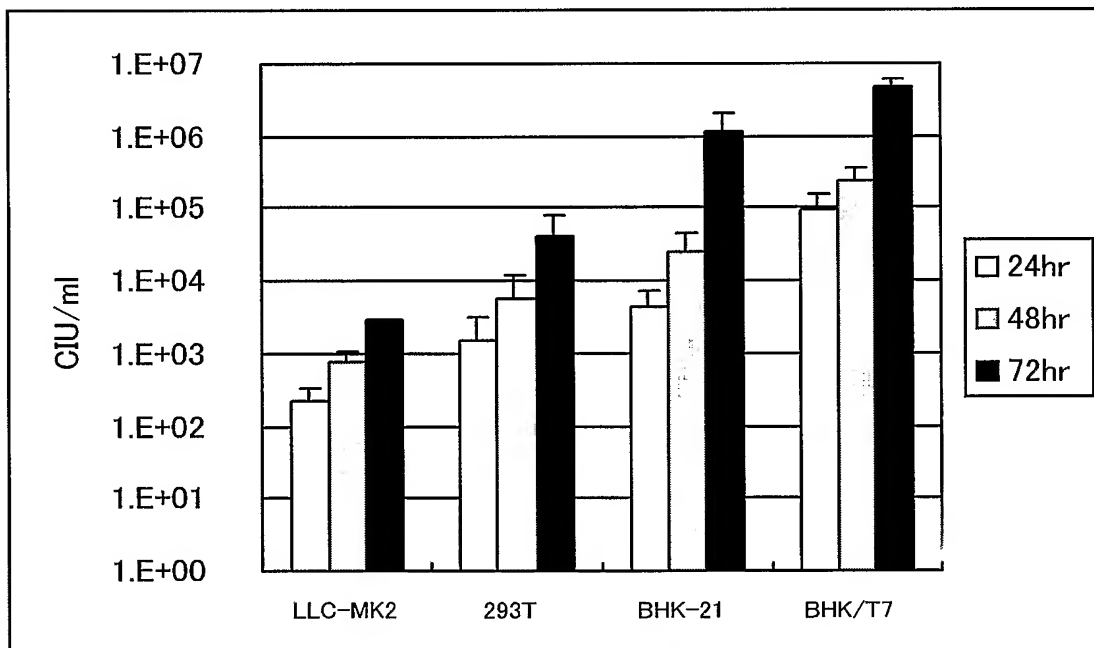
【図 16】



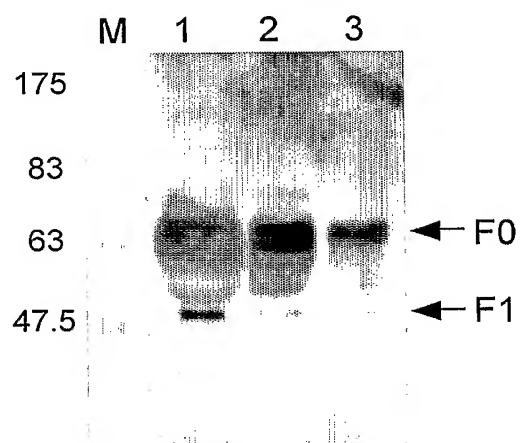
【図 17】



【図 18】



【図 19】



F5R2 から回収したウイルス粒子

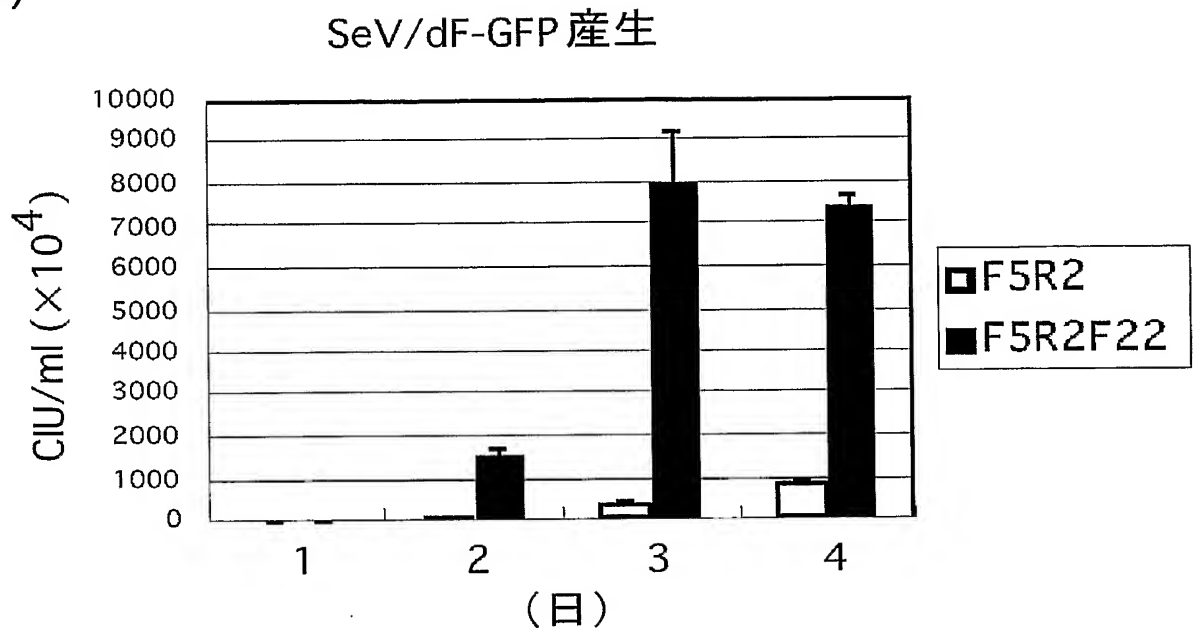
1:  $4 \times 10^7$  particles/lane

2:  $2 \times 10^7$  particles/lane

3:  $1 \times 10^7$  particles/lane

【図 20】

(A)



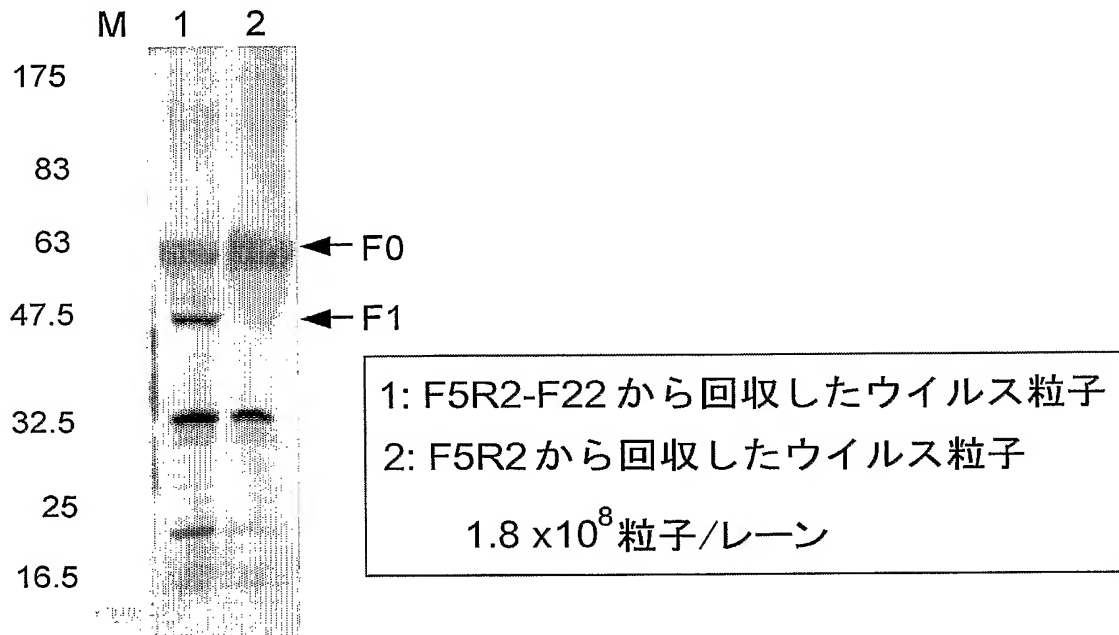
(B)

	1日	2日	3日	4日
F5R2	$3.2 \times 10^3$	$3.1 \times 10^5$	$3.8 \times 10^6$	$8.9 \times 10^6$
F5R2F22	$6.8 \times 10^3$	$1.5 \times 10^7$	$8.0 \times 10^7$	$7.4 \times 10^7$

(CIU/ml)



【図 21】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明はウイルスベクターの製造方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明は、プロテアーゼによるウイルス蛋白質の切断に増殖を依存するウイルスを、該プロテアーゼに非依存的に製造する方法を提供する。本発明のウイルス製造方法は、ウイルス蛋白質におけるプロテアーゼの切断配列を他のプロテアーゼの切断配列に改変されたウイルス蛋白質の存在下でウイルスを生産することを特徴とする。プロテアーゼの切断配列を、ウイルス生産細胞が内因的に発現するプロテアーゼの切断配列に置換することによって、より効率的にウイルスベクターを生産させることが可能となる。本発明に方法により、幅広い細胞を用いて高力価のウイルスを製造することが可能となる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 1 4 6 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 5 1 5 5 1 0 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 1 1 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号
氏 名	株式会社ダイナベック研究所